



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Implementación de una estrategia de clonación en *E. coli* de genes de *Prodiplosis longifila* Gagné con potencial para la producción de ARNdc en bacterias

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga**

AUTOR

Mónica Carola CORREA GUERRERO

ASESOR

Margarita Rosa Eugenia VELÁSQUEZ REINOSO

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Correa, M. (2018). *Implementación de una estrategia de clonación en E. coli de genes de Prodiplosis longifila Gagné con potencial para la producción de ARNdc en bacterias*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 09:10 horas del 12 de octubre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga de **MÓNICA CAROLA CORREA GUERRERO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 011-EPGB-2018, la titulando expuso su tesis: **"IMPLEMENTACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CLONACIÓN EN *E. coli* DE GENES DE *Prodiopsis longifila* Gagné CON POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ARNdc EN BACTERIAS"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18... , calificativo: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga a **MÓNICA CAROLA CORREA GUERRERO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 10:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 12 de octubre de 2018.

Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(PRESIDENTE)

Bga. MARGARITA VELASQUEZ REINOSO
(ASESORA)

Dr. DAN VIVAS RUIZ
(MIEMBRO)

Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mi padre, por ser mi ejemplo de lucha; a mi madre, por guiarme a ser soñadora, y a mis hermanas, por apoyarme y aconsejarme.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora interna Margarita Velásquez, por todas sus sugerencias y apoyo para culminar esta tesis.

A mi asesor externo Luis De Stefano, por brindarme la oportunidad de realizar la tesis en el Laboratorio de Genómica Funcional – LID - UPCH.

A mis amigos: Antoine Geneste y Marianella Ayala, participantes de este proyecto, con quienes compartí las frustraciones y alegrías de todos los trabajos de investigación que realizamos juntos.

A la empresa CAMPOSOL S. A., por el suministro de las muestras de *Prodiplosis longifila*, y de los reactivos necesarios para la realización del presente trabajo.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Fondos del contrato: 006-FINCYT-FIDECOM-PIPEA-2013 asignados al proyecto: “CONTROL DEL ATAQUE DEL DÍPTERO *Prodiplosis longifila* DEL CULTIVO DE ESPÁRRAGO (*Asparagus officinalis*) MEDIANTE LA INGESTA DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE dsARN DIRIGIDOS A GENES IMPORTANTES EN SUS DIFERENTES ESTADIOS”.

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|--|------|
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 2.1 <i>Prodiplosis longifila</i> Gagné | 3 |
| 2.2 ARN de interferencia (ARNi) | 5 |
| 2.3 ARNi en el control de plagas | 7 |
| 2.4 Administración del ARNdc al insecto..... | 9 |
| 2.5 Producción del ARNdc | 12 |
| 2.6 Clonación celular de ADN | 14 |
| 2.7 Transformación bacteriana..... | 19 |
| 3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS..... | 20 |
| 4 MATERIAL Y MÉTODOS | 21 |
| 4.1 Selección de las secuencias de los genes blancos | 22 |
| 4.2 Diseño de cebadores | 23 |
| 4.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc | 23 |
| 4.4 PCR de los genes blancos | 24 |
| 4.5 Extracción del vector Litmus 38i..... | 26 |
| 4.5.1 Extracción por lisis alcalina | 26 |
| 4.5.2 Extracción con kit..... | 27 |
| 4.6 Modificación del vector | 28 |

| | Pág. |
|--|------|
| 4.6.1 Linearización del vector | 28 |
| 4.6.2 Adición de timina al vector | 28 |
| 4.6.3 Autoligación del vector | 29 |
| 4.7 Ligación del producto de PCR al vector | 29 |
| 4.8 Obtención de bacterias transformadas con vectores recombinantes..... | 30 |
| 4.8.1 Preparación de células quimiocompetentes | 30 |
| 4.8.2 Transformación de bacterias..... | 31 |
| 4.8.3 Verificación de la presencia del inserto | 31 |
| 4.9 Almacenaje de las bacterias transformadas | 32 |
| 5 Resultados | 33 |
| 5.1 Obtención de cebadores de los genes blancos | 33 |
| 5.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc | 34 |
| 5.3 PCR de los genes blancos | 37 |
| 5.4 Obtención del vector Litmus 38i modificado | 39 |
| 5.4.1 Extracción del vector Litmus 38i..... | 39 |
| 5.4.2 Modificación del vector..... | 41 |
| 5.5 Transformación de células <i>E. coli</i> Novablu..... | 42 |
| 6 Discusión | 47 |
| 7 Conclusiones..... | 52 |
| 8 Referencias bibliográficas | 53 |
| 9 Anexos..... | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Esquema de larva de <i>Prodiplosis longifila</i> | 5 |
| Figura 2. Esquema del silenciamiento mediado por ARNi. | 7 |
| Figura 3. Formas de entregar el ARNdc al insecto el control de plagas..... | 12 |
| Figura 4. Esquema de producción de ARNdc en <i>E. coli</i> HT115..... | 14 |
| Figure 5. Esquema del vector pLITMUS. | 17 |
| Figure 6. Esquema de la clonación de genes. | 18 |
| Figura 7. Diagrama de flujo general de los pasos metodológicos | 22 |
| Figura 8. Medidas espectrales del ARN total aislado de larvas de <i>P. longifila</i> | 35 |
| Figura 9. Gel de agarosa al 1% con muestras de ARN total de larvas de <i>P. longifila</i> | 36 |
| Figura 10. Gel de agarosa al 1.5% con los amplicones del ADNc de <i>P. longilia</i> | 37 |
| Figura 11. Gel de agarosa al 1.5% con los amplicones de 16 genes blancos..... | 38 |
| Figure 12. Gel de agarosa al 1% con el vector Litmus 38i extraído por lisis alcalina..... | 40 |
| Figura 13. Gel de agarosa al 1% con el vector Litmus 38i extraído por el Kit..... | 40 |
| Figura 14. Gel de agarosa al 1% con vectores modificados autoligados. | 41 |
| Figure 15. Placa de agar con bacterias transformadas con vectores modificados por PCR. | 42 |
| Figure 16. Placas de agar con bacterias transformadas con vectores modificados por reacción de Transferasa..... | 43 |
| Figure 17. Gel de agarosa al 1.5% con con amplicones a partir de vectores extraídos de bacterias transformadas. | 44 |
| Figure 18. Gel de agarosa al 1.5% con vectores recombinantes de los genes 1.1 y 21.2, sometidos a digestión..... | 45 |
| Figura 19. Gel de agarosa al 1.5% con vectores recombianes de los genes 21.2 y 25.1, sometidos a digestión..... | 46 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Prodiplosis longifila</i> según Gagné (1986) | 3 |
| Tabla 2. Componentes (A) y ciclaje (B) de la reacción de PCR de las secuencias de los genes a clonar..... | 25 |
| Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para la modificación del vector..... | 28 |
| Tabla 4. Componentes de la reacción de transferasa para modificación del vector | 29 |
| Tabla 5. Componentes de la reacción de ligación del inserto con el vector modificado.... | 30 |
| Tabla 6. Componentes de la reacción de digestión con el vector clonado | 32 |
| Tabla 7. Cebadores de las secuencias de genes utilizados | 33 |
| Tabla 8. Lecturas en el espectrofotómetro del vector Litmus 38i purificado | 39 |
| Tabla 9. Componentes del medio LB líquido..... | 60 |
| Tabla 10. Componentes del medio SOC..... | 60 |

RESUMEN

Las estrategias biotecnológicas presentan un alto potencial para el control de plagas de insectos; una de ellas, es el silenciamiento de genes mediado por ARN de interferencia (ARNi), que se aplica contra genes importantes en la viabilidad del insecto. Entre las principales ventajas, se menciona, su uso como alternativa de los pesticidas, además de poder desarrollarse para un ataque específico contra la especie blanco. Para una futura implementación en campo, se debe contar con una serie de pasos técnicos estandarizados, entre los cuales involucra la producción de ARN de doble cadena (ARNdc), que es la molécula inductora del mecanismo de ARNi. En este trabajo se presenta una metodología de clonación de genes para la síntesis de ARNdc en bacterias a partir de secuencias de genes del insecto *Prodiplosis longifila* Gagné, plaga principal de los cultivos de espárrago en el Perú. Se utiliza la técnica *TA cloning*, en la que se aprovecha la actividad transferasa terminal de la enzima polimerasa de *Thermus aquaticus* para modificar los productos de PCR. El vector modificado para esta técnica se obtuvo a partir del vector LITMUS 38i, al que se linearizó y se le agregó un nucleótido de timina. Los resultados muestran que la metodología permitió clonar, en corto tiempo, secuencias provenientes de 18 genes del insecto, resultando así en una metodología conveniente para su uso en la producción de ARNdc en estrategias de ARNi.

Palabras clave: ARNi, *Prodiplosis longifila* Gagné, Litmus 38i, *TA cloning*, mosquilla del brote.

ABSTRACT

Biotechnological strategies have a high potential for the control of insect pests; one of them is the gene silencing mediated by RNA interference (RNAi), which is applied against important genes in the viability of an insect. Among the main advantages is its use as an alternative to pesticides, in addition to its develop for a specific attack against the target species. Its future implementation in the field must require a series of standardized technical steps, among them the production of double-stranded RNA (dsRNA), which is the molecule that induces the mechanism of RNAi. In this work, a gene cloning methodology for the synthesis of dsRNA in bacteria from gene sequences of the insect *Prodiplosis longifila* Gagné, which is the main pest of asparagus crops in Peru, is presented. In this methodology, the *TA cloning* technique is employed, in which terminal transferase activity is used of the *Thermus aquaticus* polymerase enzyme, to the PCR products. The modified vector for this technique was obtained from the vector LITMUS 38i, to which it was linearized and a thymine nucleotide was added. The results show that the methodology allowed to clone, in short time, sequences from 18 genes of the insect, resulting in a suitable methodology for the production of dsRNA in RNAi strategies.

Keywords: RNAi, *Prodiplosis longifila* Gagné, Litmus 38i, *TA cloning*, mosquilla del brote

1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las principales plagas de la mayoría de cultivos son por insectos. Para su control se cuentan con diferentes estrategias clásicas entre las que están: el control cultural, etológico y químico (Huvenne y Smagghe, 2010). Los métodos químicos son los más rápidos y eficaces en comparación con los otros, sin embargo, entre sus principales desventajas asociadas están su persistencia y contaminación en el medio ambiente, así como los relacionados con los problemas de la salud (Zhang *et al.*, 2013). En la actualidad, se puede observar que estos métodos aún resultan insuficientes para el adecuado control de plagas, llevando, en muchos casos, al uso de pesticidas de manera descontrolada, lo cual hace que la plaga pueda adquirir resistencia a los productos químicos (Tabashnik *et al.*, 2008).

Desde hace décadas, se viene realizando estudios con el mecanismo de silenciamiento génico mediado por ARN interferencia (ARNi), para su posible aplicación en el control de plagas. De las investigaciones realizadas para conocer las moléculas implicadas, características interesantes la han hecho atractivo para proponerla para el control de plagas. Entre ellas se encuentra que el ARNdc (ARN doble cadena) suministrado vía oral a insectos, mediante ingesta en dietas artificiales, la cuales capaz de desarrollar el mecanismo de ARNi y por lo tanto, el fenotipo de silenciamiento (Fire, 2007). Se han publicado trabajos en los que se aplica esta técnica en distintos órdenes de insectos como Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera y Phthiraptera; revisados en el artículo de Huvenne y Smagghe (2010).

Uno de los primeros pasos a optimizar para implementar una estrategia de silenciamiento génico con ARNi es la producción de ARNdc (la molécula inductora del mecanismo de ARNi), para lo cual diversos trabajos (Terenius *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013) concuerdan

con la necesidad de contar con una metodología de producción de ARN que permita solucionar los siguientes desafíos centrales:

- Producción de altas concentraciones de ARNdc para cada uno de los genes a ensayar, debido a que el insecto debe tomar por ingesta el ARNdc de su ambiente y éste debe llegar en dosis adecuadas al intestino del insecto.
- Producción de ARNdc de una múltiple colección de genes debidamente seleccionados, ya que se observa en los estudios previos, que solo un pequeño porcentaje de los genes evaluados muestran el efecto deseado.

De acuerdo con lo mencionado, el presente estudio plantea una metodología de clonamiento fácil de desarrollar en laboratorio, que permita la producción de ARNdc en bacterias modificadas para su uso en ARNi. Para su implementación se escogieron secuencias de ADN con características para ser blancos de ARNi, de una de las principales plagas que enfrenta el cultivo del espárrago (*Asparagus officinalis*), que es la “mosquilla del brote”, como se conoce al díptero *Prodiplosis longifila* Gagné (Díptera: Cecidomyiidae) (Díaz *et al.*, 1981). La eficacia de la metodología planteada fue comprobada por distintos ensayos.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 *Prodiplosis longifila* Gagné

Es una especie polífaga neotropical (Gagné, 1986), causante de daños económicos importantes en muchas especies cultivables del Perú, y es conocida como “mosquilla del brote” (Díaz *et al.*, 1981). Así mismo, es la principal plaga de los espárragos en el país, siendo las larvas las que raspan el tejido causando mayor daño, provocando la distorsión y deformación de los brotes en las primeras etapas del desarrollo fenológico del espárrago (Cedano y Cubas, 2012). Este insecto fue caracterizado y clasificado por Gagné en 1986 (Tabla 1) cuando evaluó a insectos que se alimentaban de los ovarios de las flores de lima (Peña *et al.*, 1989).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Prodiplosis longifila* según Gagné (1986)

| | |
|--------------|------------------------------------|
| Reino | <i>Animalia</i> |
| Phylum | <i>Arthropoda</i> |
| Clase | <i>Insecta</i> |
| Subclase | <i>Pterigota</i> |
| División | <i>Endopterigota</i> |
| Orden | <i>Diptera</i> |
| Suborden | <i>Nematocera</i> |
| Infraorden | <i>Bibionomorpha</i> |
| Superfamilia | <i>Sciaroidea</i> |
| Familia | <i>Cecidomyiidae</i> |
| Subfamilia | <i>Cecidomyiinae</i> |
| Género | <i>Prodiplosis</i> |
| Especie | <i>Prodiplosis longifila</i> Gagné |

Como se indicó este insecto ataca también a otros cultivos, entre ellos el tomate, papa, espinaca, alcachofa, pimiento, frijol, melón, paltar; árboles frutales como palto, cítricos y diversas malezas. Entre los principales factores que favorecen su proliferación están: la humedad, ya que tienden a incrementar las poblaciones debido a que las pupas encuentran la mejor condición para completar su ciclo; la temperatura, bajo condiciones de temperatura alta hay una mayor reproducción, los ciclos se acortan; sin embargo, temperaturas bajas, menores a 15 °C, reducen el nivel de ovoposición (Rodríguez, 2011).

El ciclo de vida de *P. longifilla* tiene varias etapas: huevo, larva, pre-pupa, pupa y adulto. El adulto es una mosquita de entre 0.8 a 1.3 mm de longitud, aproximadamente, con dimorfismo sexual; la larva es muy pequeña y transparente y pasa por tres estadios, siendo las larvas I y II las más perjudiciales y las que ocasionan el daño en flores y brotes de diferentes cultivos (Rodríguez, 2011; Valarezo *et al.*, 2003).

Un esquema de la larva se puede apreciar en la Figura 1. La diferencia resaltante entre los estadios de la larva es su tamaño y color. La larva I mide aproximadamente 0.51 mm, la larva II, 1.14 mm y la larva III, 1.77 mm. La coloración va desde transparentes en larva I tornándose blanco transparente en larva II, y luego pasando a blanco hueso en larva III de acuerdo a las condiciones de la estación experimental Boliche-INIAP-Ecuador (Valarezo *et al.*, 2003).

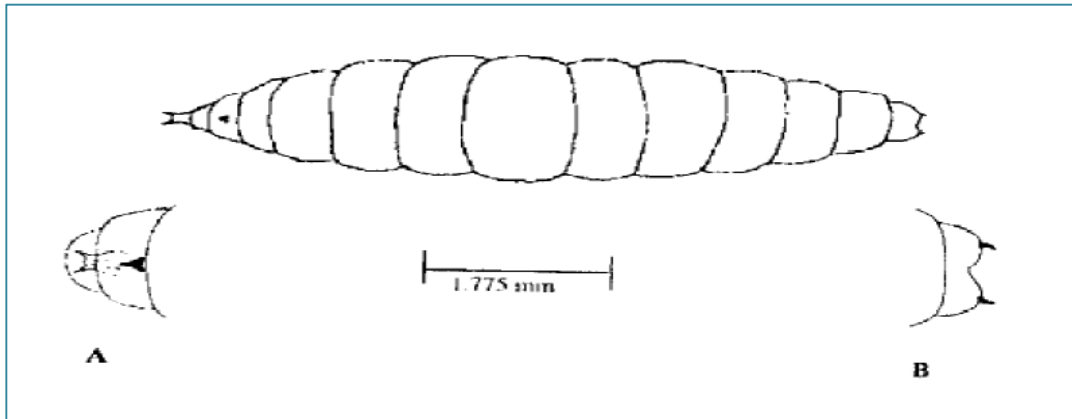


Figura 1. Esquema de larva de *Prodiptosis longifila*. A. Cápsula cefálica B. Espiráculos caudales. Fuente: Valerazo *et al.*, 2003

2.2 ARN de interferencia (ARNi)

El silenciamiento génico mediado por ARNi es un mecanismo génico post-transcripcional relativamente conservado en muchos eucariotas. Es uno de los mecanismos responsables de la regulación génica específica y sirve para la defensa contra el ADN anormal. Este mecanismo permite degradar o inhibir la transcripción a partir del ARNdc exógeno o endógeno, impidiendo así su traducción a proteína (Fire, 2007).

El trabajo de Napoli *et al.*, (1990), fue uno de los primeros registros de la acción del ARNi. Mientras los investigadores evaluaban la sobreexpresión del gen CHS (Chalcona sintasa) en pétalos de petunia, luego de introducir ese gen modificado, inesperadamente, encontraron que el gen introducido creó un bloque en la biosíntesis de antocianinas. En ese entonces explicaron ese resultado a un fenómeno de co-supresión y a la posible participación de la regulación metilación. Luego, Fire (1998), reportó sus experimentos con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* que permitieron elucidar el mecanismo de ARNi.

En el mecanismo de ARNi ocurren interacciones entre complejos enzimáticos y los ARN pequeños de doble cadena (siARN), que actúan sobre el ARN blanco. Un esquema se

puede apreciar en la Figura 2. En resumen, este mecanismo puede ser descrito en 3 etapas (Fire, 2007; Siomi y Siomi, 2009):

1.- El ARN largo de doble cadena (ARNdc), que es expresado naturalmente o introducido artificialmente en una célula, es procesado a ARNs pequeños de doble cadena (siARN), por la acción de una enzima de la familia de la Ribonucleasa III conocida como Dicer.

2.- Estos dúplex son desenrollados y una de las dos cadenas es preferencialmente captada por un complejo proteico conocido como: complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

3.- A través del ARN captado, el complejo localiza entre los ARNs expresados de la célula los potenciales blancos. Luego la endonucleasa presente en el RISC (llamada también Argonauta) corta el ARN blanco, interfiriendo por ende con la expresión de ese gen blanco.

Es importante mencionar que los dúplex de ARN, producto de la acción de la Ribonucleasa III, son clasificados en la literatura de acuerdo a sus precursores. Los siARN son ARNs cortados de un ARNdc largo, introducidos artificialmente o derivados de una infección viral, mientras que el procesamiento de los ARNs *stem-loops*, codificados en el genoma de la célula genera micro-ARNs. En todos los casos convergen en una característica en común, y es que todos esos ARNs pequeños son procesados por la proteína Argonauta para llevar a cabo el silenciamiento de genes.

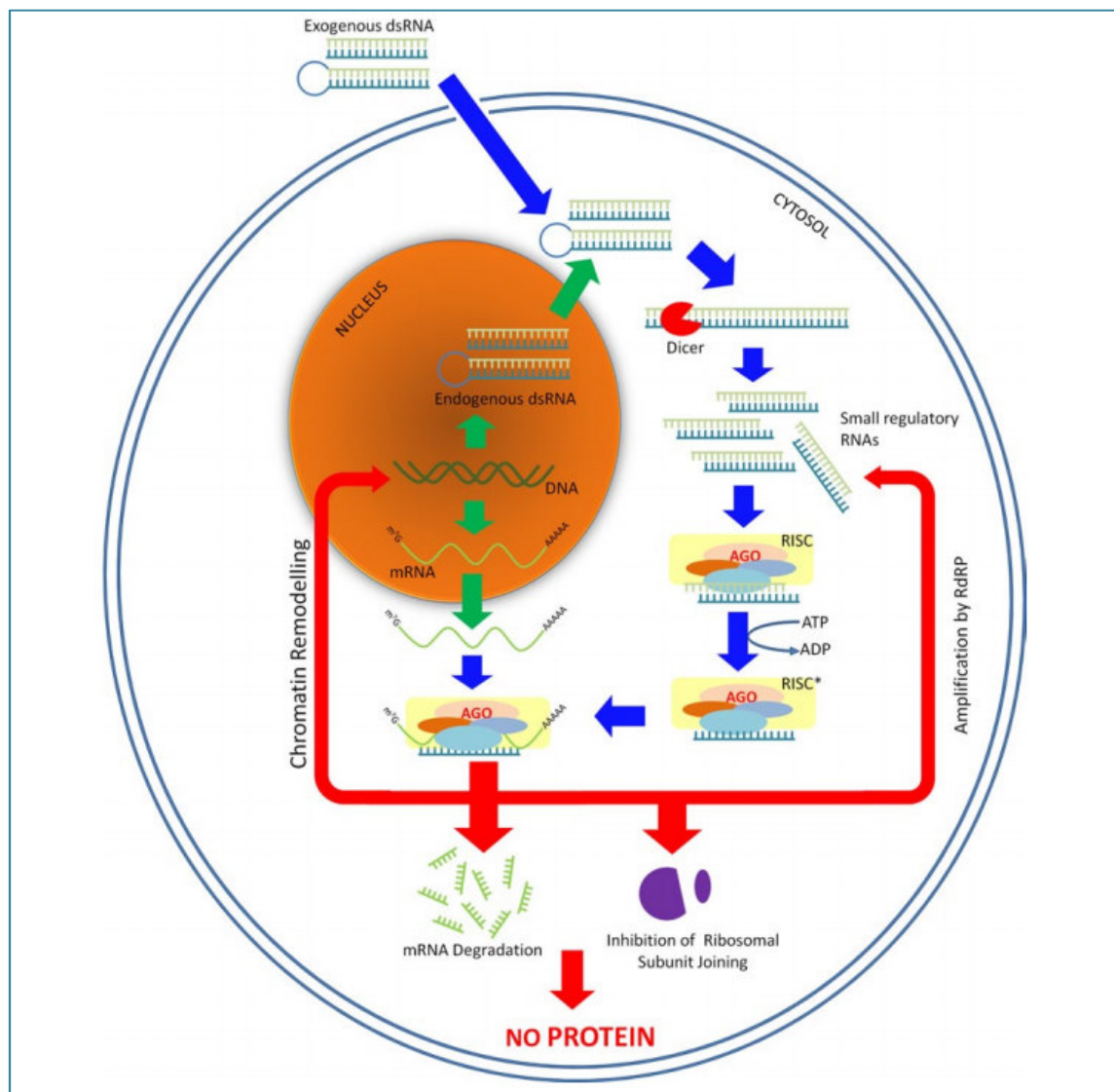


Figura 2. Esquema del silenciamiento mediado por ARNi. AGO, Argonauta; RISC, complejo de silenciamiento inducido por ARN; mRNA, ARNm; dsRNA, ARNdc; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosin difosfato, RdRP, ARN polimerasa dependiente de ARN. Fuente: Saurabh *et al.*, 2014

2.3 ARNi en el control de plagas

El ARNi proporciona una herramienta para el análisis funcional de genes en condiciones *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de estrategias de pérdida de función, sobre todo en organismos no tan conocidos, para los que las líneas transgénicas estables no están disponibles. Desde hace unas décadas también se le ha adjudicado un enorme potencial

para ser utilizado como una estrategia del control de plagas de insectos, debido a que diversos estudios de revisión demuestran que el silenciamiento de genes blancos por ARNi puede producir la muerte de insectos (Huvenne y Smagghe, 2010; Mamta y Rajam, 2017; Zhang, *et al.*, 2013). La principal ventaja de la posible aplicación de este sistema es que deja obsoleto el uso de pesticidas químicos y al mismo tiempo, al estar basado en secuencias génicas del insecto, actúa de manera específica contra la plaga a combatir y no contra otros insectos no dianas o útiles (Yu *et al.*, 2013).

El empleo del mecanismo del ARNi que silencien diferentes genes importantes para el desarrollo de diversos estadios de un insecto constituye un novedoso sistema de control de plagas, sin embargo, existen numerosos retos por afrontar para su aplicación en campo. Las dos principales limitaciones que se discute para su uso son: la eficacia de las secuencias de los genes blancos seleccionados y el abastecimiento exitoso de ARNdc en el insecto (Zhang, *et al.*, 2013).

Entre los factores relacionados a la eficacia de las secuencias de los genes blancos seleccionados, están la identificación de los genes, así como las características de la secuencia. Las principales estrategias adoptadas por los investigadores para la selección de los genes blancos son la búsqueda de genes homólogos (comparado a genes en las que ya se ha establecido la eficacia del silenciamiento) y el *screening* de alto rendimiento a escala genómica. La búsqueda de genes homólogos es la opción preferida debido a que es un método rápido y simple, sin embargo, en muchos insectos que forman parte de las plagas pierden la secuencia en su genoma o no presentan la información de su anotación, o probablemente al secuenciar el gen se encuentran diferencias al homólogo y entonces la función del gen es difícil de predecir e incluso puede no tener la relevancia en el organismo inicial en comparación. Así puntualizan Terenius *et al.*, (2011) en que observan diferencias en la eficiencia para un mismo ARNi entre diferentes especies. Distintos trabajos muestran

listados de genes ensayados, así como los resultados en ARNi (Price y Gatehouse, 2008; Huvenne y Smagghe, 2010; Yang *et al.*, 2011).

En cuanto a la longitud de la secuencia para el diseño del ARNdc, Huvenne y Smagghe (2010), proveen un estudio del rango de longitud del ARNdc usado en los estudios con ARNi. Ellos muestran que el rango va desde 134 a 1842 pares de bases (pb), y que en la mayoría de esos estudios otorga un buen resultado con una longitud de 300 – 520 pb. Además, comparaciones entre las regiones de genes (del extremo 5', por ejemplo) para las cuales el ARNi es diseñado, presentan una gran variabilidad en los resultados, lo que nos ilustra la importancia de hacer un *screening* con múltiples secuencias para un gen de interés.

Ramadan *et al.*, (2007) en su protocolo para el diseño de ARNi de alta performance en células de *Drosophila*, resaltan que la región a amplificar para un ARNdc es de usualmente 400 pb a más, el cual debe ser común a todas las formas de *splicing* de modo que se eviten intrones. Por otro lado, se menciona que para minimizar los potenciales OTEs (*off target sequences*), es decir secuencias a las que no están dirigidas el silenciamiento, el blanco no debe contener alguna secuencia de 19 nucleótidos con perfecta identidad a otra secuencia del mismo genoma.

De otro lado, Horn y Boutros (2010), en la implementación de la aplicación web E-RNAi (<https://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>), que tiene como principal función el diseño de todos los reactivos para ARNi, mencionan algunas consideraciones importantes al diseñar un ARNdc, como la especificidad y eficiencia.

2.4 Administración del ARNdc al insecto

Desde la descripción inicial del mecanismo de ARNi en los estudios con *Caenorhabditis elegans* (Fire, 1998), varias características interesantes se han evidenciado del suministro

de ARNdc al organismo en estudio. Por ejemplo, se reveló que el silenciamiento por ARNi puede ser desatado al colocar los gusanos, por inmersión, en medios que contenían ARNdc, lo que también se confirmó en experimentos con planarias, hidras y abejas (Orii *et al.*, 2003; Galliot *et al.*, 2007). En *C. elegans* también se observó que se podía producir el mismo fenotipo de silenciamiento, comparado al correspondiente mutante que presenta pérdida de función, si se hacía una microinyección en la cavidad corporal o si los nemátodos ingerían bacterias productoras de ARNdc, (Timons *et al.*, 2001). Con la microinyección se puede evaluar a mayor precisión las concentraciones de ARNdc que ingresan al organismo, por lo que es el método más común en estudios funcionales, sin embargo, sólo se puede usar para experimentos de laboratorio. Si se piensa implementar el ARNi para una futura aplicación como control de plagas, los insectos por sí mismos deben de incorporar el ARNdc a su organismo, y una manera es a base de la alimentación. Esta forma de abastecer el ARNdc resulta promisorio, además de descubrirse que las características del tejido intestinal de los insectos lo hacen interesantes como lugares de captación de ARNdc, ya que se tiene una sola capa de células columnares, con microvellos, aparato endocítico y numerosos canales (Hakim *et al.*, 2010).

La entrega por ingesta de ARNdc provee varias ventajas: es menos dificultoso en la entrega al organismo, es más barato, e inclusive es aplicable para el *screening* a gran escala de genes blancos (Kamath y Ahringer, 2003). Además, es menos invasivo y más práctico al trabajar con pequeños insectos como áfidos o con las larvas de los insectos (Tian *et al.*, 2009; Walshe *et al.*, 2009). Sin embargo, esta metodología aún cuenta con fuertes limitaciones, ya que se ha observado en varios trabajos que la ingesta del ARNdc es menos efectiva que la inyección para inducir el ARNi (Araujo *et al.*, 2006). Por lo tanto, se necesita de grandes concentraciones de ARNdc para que el silenciamiento sea observable.

La ingesta del ARNdc puede darse como parte de alimentos o mediante la ingesta de plantas transgénicas que expresan ese ARNdc. Entre los trabajos pioneros que muestran la eficacia de usar estas estrategias resaltan el de Baum *et al.* (2007). En este estudio se presentó evidencia directa en la reducción del daño de la raíz en el maíz transgénico productora de ARNdc de adenosina trifosfatasa vacuolar (V-ATPasa) después de la infestación de la planta con el gusano *Diabrotica virgifera*. Un esquema de las formas de entrega para ingesta del insecto se puede apreciar en la Figura 3.

Por último, una forma de entrega más efectiva del ARNdc se ha incorporado en la lucha contra las plagas con el ARNi, que surge para mejorar el problema de la degradación de las moléculas de los ARNdc expuestos en el ambiente, al combinarla en las dietas artificiales, así como por la degradación en el tracto digestivo, al ser digerido; dicha estrategia consiste en la aplicación directa del ARNdc en el insecto, similar al procedimiento de aplicación de los pesticidas. El éxito de esta forma de administración de ARNdc fue ensayada para proteger plantas contra enfermedades virales a través de la aspersión de bacterias que expresan ARNdc (Gan *et al.*, 2010). Los ARNdc compuestos de secuencias de dos fragmentos de la proteína de la cubierta del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) fueron expresados en bacterias *Escherichia coli* modificadas. Los extractos crudos que presentaban grandes cantidades de ARNdc fueron rociados en las plantas y se confirmó la eficacia, pues se redujo el daño en las plantas. Este, junto a otros estudios, como el de Wang *et al.* (2011), proporcionan nuevos descubrimientos que demostrarían que el ARNdc puede atravesar la cubierta corporal, el estoma y las membranas para ejercer el papel de desencadenamiento del ARNi, por lo que se abre la posibilidad de aplicarlo en el campo, similar a los insecticidas tradicionales. Sin embargo, en todas las formas de abastecer el ARNdc se observa la necesidad de contar con un método que específicamente

modifique y/o recubra el ARNdc, ya sea para mejorar su absorción por el intestino y/o mejorar su estabilidad en el ambiente.

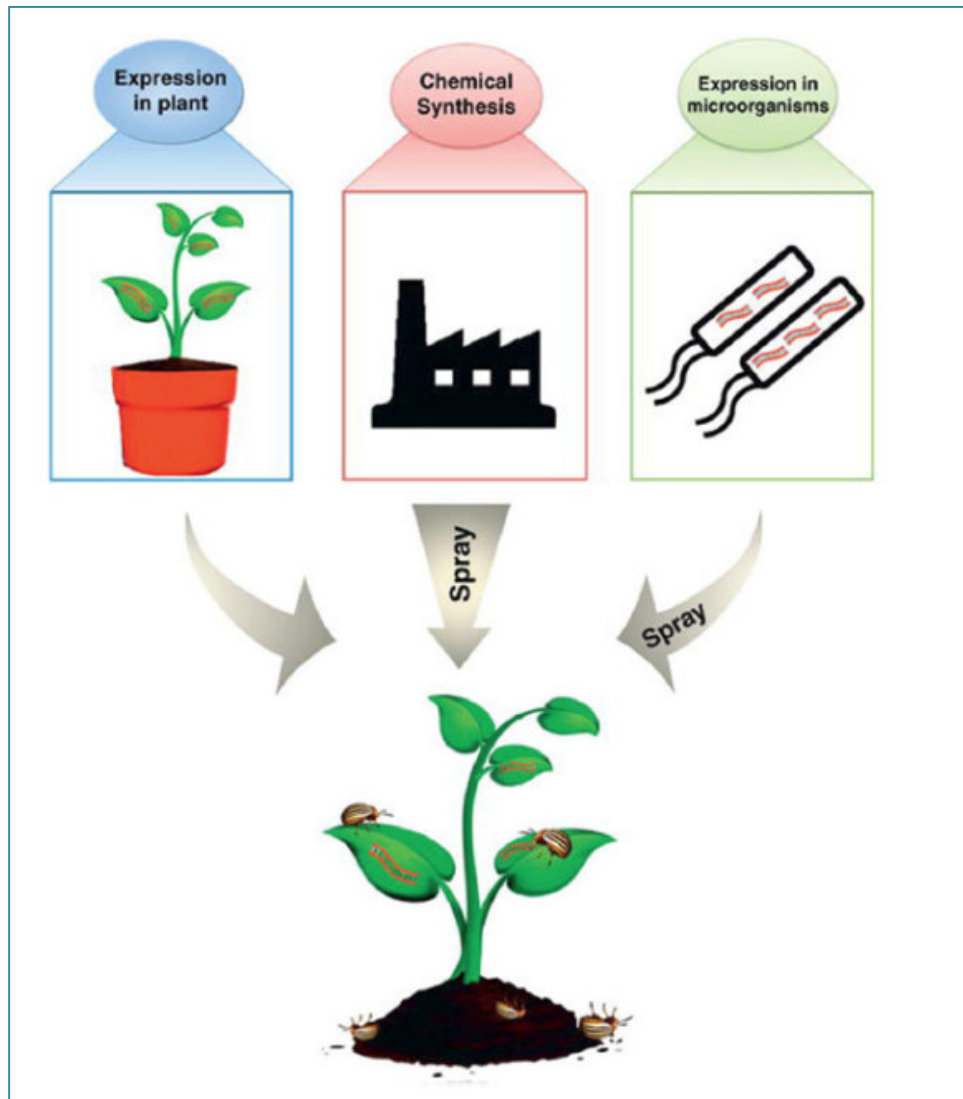


Figura 3. Formas de entregar el ARNdc al insecto el control de plagas. Fuente: Mamta y Rajam, 2017

2.5 Producción del ARNdc

Como se mencionó previamente, para una posible aplicación en el control de plagas, el ARNdc, inductor del mecanismo de ARNi, debe ser incorporado al organismo del insecto en suficientes dosis para su acción y preferiblemente mediante su ingesta o aplicando las moléculas directamente sobre los insectos; se puede observar, a partir de los distintos

reportes (Zhu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Price y Gatehouse, 2008; Huvenne y Smagghe, 2010; Terenius *et al.*, 2011), que dos principales estrategias para la producción de ARNdc, son utilizadas con aceptación. La primera, es en la que el ARNdc puede ser expresado a partir de bacterias modificadas, y el segundo es en la que el ARNdc puede ser sintetizado *in vitro*, en el que se usa ARN polimerasa y dos promotores T7 en ambos extremos del ADN a transcribir. La primera estrategia presenta ventajas notorias frente a la otra. Estas son: la posibilidad de producir el ARNdc en mayor cantidad y continuamente a un considerable menor costo, y la mejor protección del ARNdc en el tiempo.

Para el desarrollo de la producción de ARNdc en bacterias se debe escoger una cepa bacteriana que permita la estabilidad del ARNdc, entre ellas se cuenta con la bacteria *E. coli* HT115 (DE3) creada por Lisa Timons (2001) en sus estudios de ARNdc por ingesta en *C. elegans*. Esta cepa es deficiente en ARNsa III de *E. coli* con la actividad de la polimerasa T7 inducible por IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). La cepa está disponible en el Centro de Genética Caenorhabditis (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/>). El genotipo es el siguiente: F-, MCRA, McrB, IN (rrnD-rrnE) 1, lambda -, rnc14:: Tn10 (DE3 lisógeno: lavUV5 promotor -T7 polimerasa) (polimerasa de T7 inducible por IPTG) (ARNsa III menos). Un esquema de lo que sucede en esta bacteria para producir ARNdc se muestra en la Figura 4. La expresión de la ARN polimerasa T7 de la bacteria, es inducida por la presencia de IPTG o lactosa en el medio de crecimiento. Esta enzima reconoce ambos promotores T7, presentes en el plásmido L4440, y transcribe la secuencia a ARNdc.

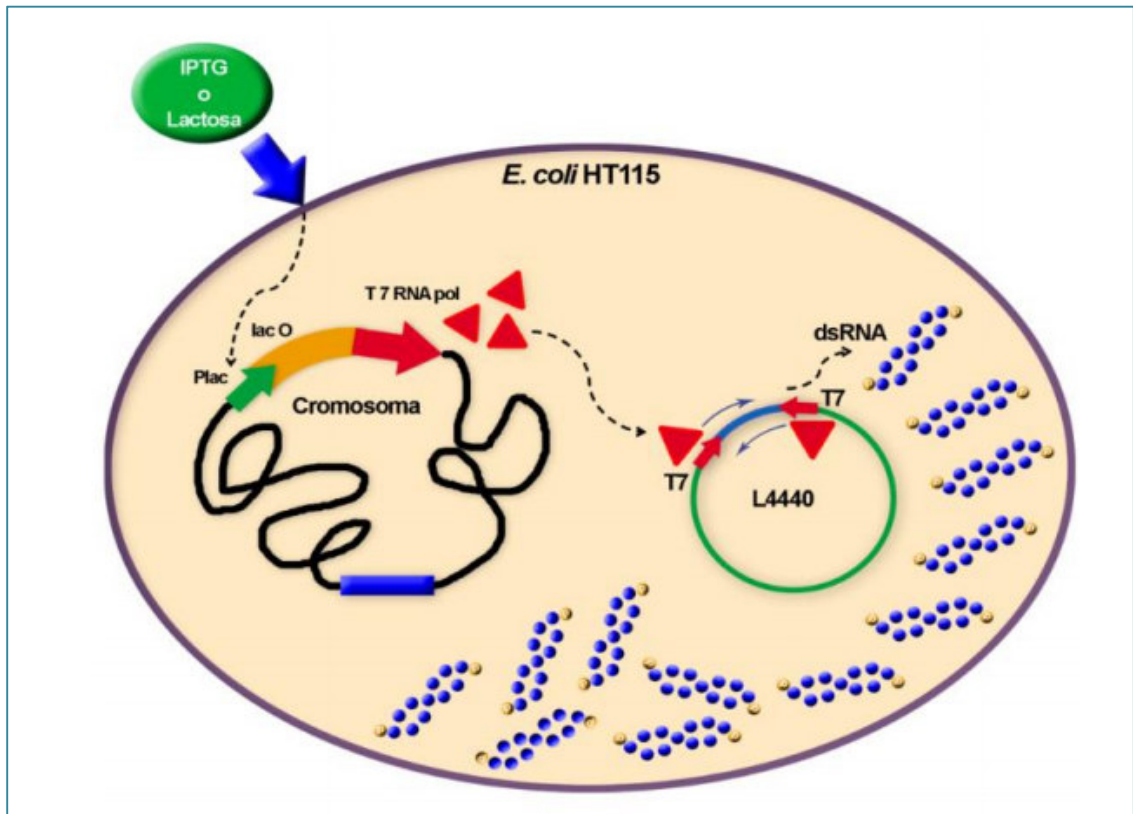


Figura 4. Esquema de producción de ARNdc en *E. coli* HT115. Lac O, operón lactosa; T7 RNA pol, ARN polimerasa T7; dsRNA, ARNdc; Plac, promotor lactosa; IPTG, Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido. Fuente: Papic *et al.*, 2015

2.6 Clonación celular de ADN

Para que la bacteria *E. coli* HT115 produzca ARNdc de un gen blanco es necesaria, la clonación de genes dianas para su transcripción a ARNdc.

La clonación celular de ADN tiene como objetivo principal la producción de un gran número de copias de un segmento de ADN, para lo cual se aprovecha la maquinaria enzimática presente en una célula hospedera. La clonación se emplea para distintos fines. Por ejemplo, puede ser utilizada para analizar la secuencia del ADN y/o para expresar la proteína de ese ADN que puede constituir un gen (Luque y Herráez, 2006).

La tecnología para producir ADN recombinante fue el paso clave para lograr la clonación celular de ADN. Un ADN recombinante refiere a un ADN creado artificialmente en el que se encuentran unidas secuencias de ADN, que no se encontrarían juntas en la naturaleza (Primrose y Twyman, 2013). El ADN recombinante se obtiene a partir de la manipulación de ADN y de enzimas con actividades específicas que pueden ser controladas; principalmente, ligasas y nucleasas. Entre las últimas se tiene a las endonucleasas de restricción, que permiten cortar las moléculas de ADN en posiciones definidas, por lo que es posible predecir las posiciones de los cortes a partir de la información de la secuencia. Por ejemplo, la enzima *EcoRI* (aislada de *E.coli*) corta sólo en el hexanucleótido 5'-GAATTC-3'. En general las enzimas de restricción pueden cortar el ADN a través de un corte simple o por cortes en posiciones diferentes entre las dos cadenas, con una separación de dos a cuatro nucleótidos. Las primeras, generan un extremo romo, las segundas, generan un extremo cohesivo. Un apareamiento entre las bases complementarias entre fragmentos de ADN con extremos cohesivos, es posible a través de ligasas. La ligasa más utilizada se obtiene de *E. coli* infectada por el bacteriófago T4 (Brown, 2008; Luque y Herráez, 2006).

A la célula hospedera se le introduce el ADN recombinante que consta de un fragmento de ADN unido a un vector, que es el ADN que aporta la capacidad de replicación ya que tiene capacidad de replicación autónoma (es decir, independiente de la replicación del genoma de la célula hospedera). Se pueden utilizar genomas de bacteriófagos como vectores de clonación, pero los más utilizados son los plásmidos, cuando se trata de clonación en bacterias (Brown, 2008).

Los plásmidos normalmente presentan: 1) un origen de replicación que es reconocido por la ADN polimerasa para iniciar la transcripción, 2) un gen de resistencia a ampicilina que permite a la célula tolerar el efecto inhibitorio de crecimiento por parte del antibiótico

presente en el medio de cultivo, por lo que funciona como un marcador seleccionable de las células que si presentan el plásmido, 3) un gen lacZ que codifica parte de la enzima B-galactosidasa, la cual transforma el sustrato sintético X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) en un producto de color azul, por lo que constituye también un marcador seleccionable de clones. Normalmente existe un lacZ en el cromosoma de *E.coli*, pero se utiliza los mutantes de *E.coli* que presentan un lacZ modificado y que sin la presencia del plásmido no podrían codificar la B –galactosidasa (Brown, 2008; Luque y Herráez, 2001).

Un ejemplo de vector comercial para utilizarlo en estudios de expresión, se muestra en la Figura 5. Como se observa, este plásmido presenta adicionalmente a lo anteriormente mencionado, dos promotores T7 (secuencias a la que se une la enzima ARN polimerasa). Estos promotores se encuentran en sentidos opuestos, lo que hace posible la transcripción de ARN en ambos sentidos, produciendo ARN de doble cadena (ARNdc).

Los pasos generales de un procedimiento de clonación se muestran a continuación (Brown, 2016), (Figura 6):

1. Obtención del segmento de ADN que se desea clonar (a veces referido como inserto). Los fragmentos de ADN para clonar son obtenidos por PCR, y presentan los sitios específicos para las enzimas de restricción seleccionadas, estos nucleótidos normalmente son añadidos en el mismo proceso de la PCR.
2. Ligación de los insertos en el apropiado vector de clonación. Un fragmento de ADN, que puede ser parte, o que contenga a un gen, es ligado al vector para producir una molécula de ADN recombinante.
3. Transformación del vector recombinante (ver sección 2.7) en la bacteria u otra célula hospedera. Este vector transporta el fragmento de ADN en una célula hospedera. Dentro de ella, el vector se multiplica, produciendo copias idénticas, por lo que también produce copias del fragmento de ADN insertado. Cuando la célula

hospedera se divide, copias del vector son pasados a la progenie y nuevamente se produce múltiples copias.

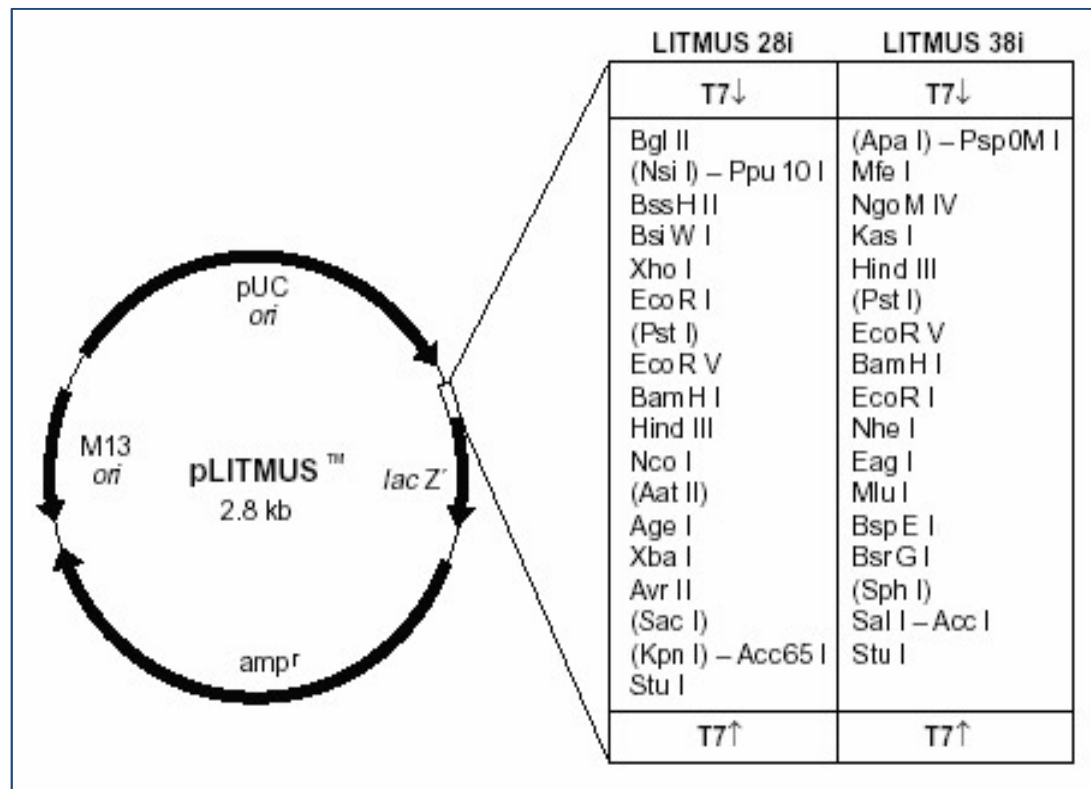


Figure 5. Esquema del vector pLITMUS. amp^r, gen de resistencia a la ampicilina; lacZ', gen lacZ; M13ori y pUC ori, origen de replicación compatible con plásmidos de la serie pUC y M13. En los recuadros se observa las enzimas de restricción compatibles entre los promotores T7 para el vector LITMUS 28i y LITMUS 38i. Fuente: New England Biolabs, 2018.

- Selección de células hospederas que presentan el vector recombinado. Luego de muchas divisiones celulares, una colonia de idénticas células hospederas es producida. Cada célula de la colonia contiene uno o más copias de vectores recombinantes. En este paso se selecciona los clones mediante los marcadores de selección.

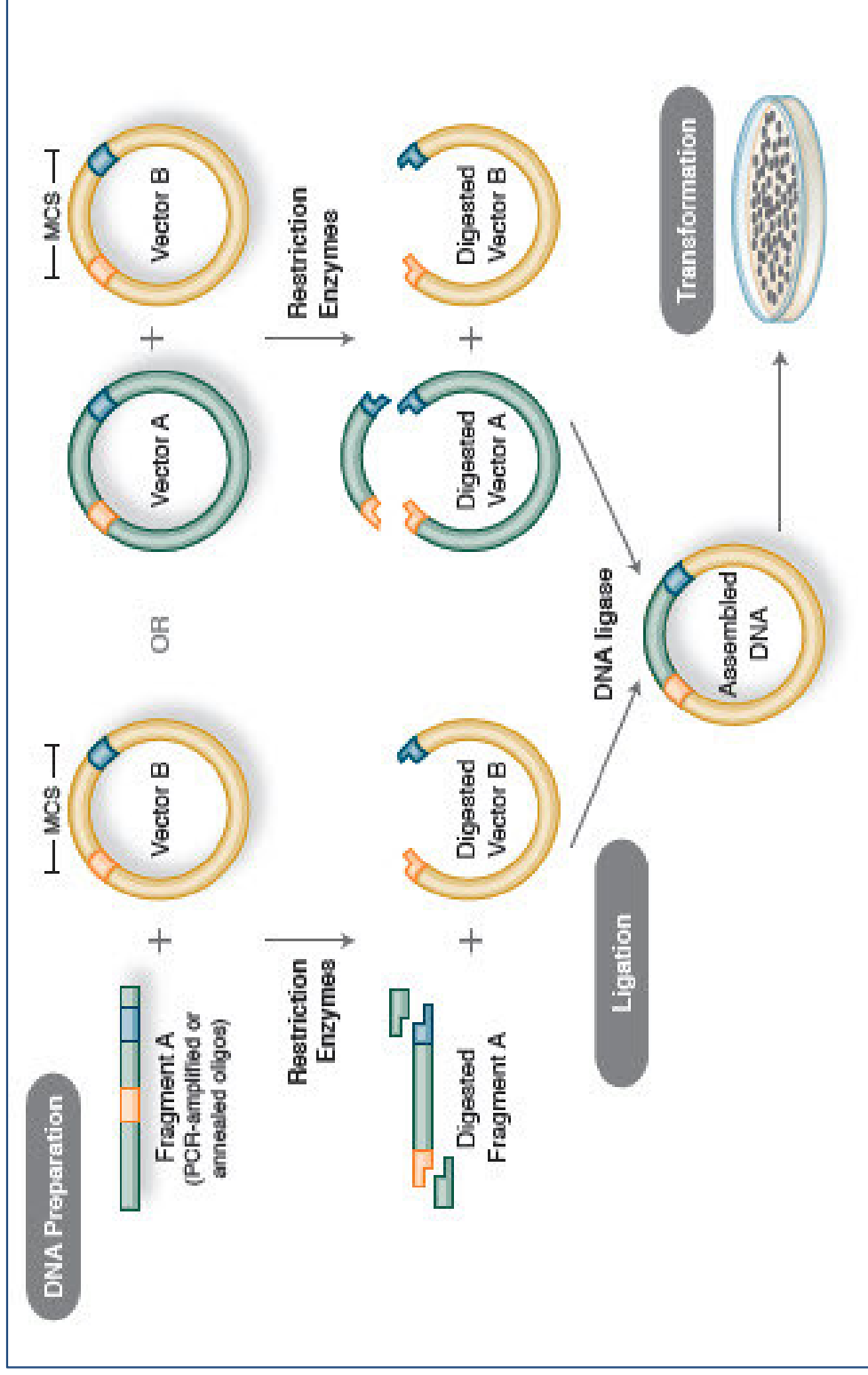


Figure 6. Esquema de la clonación de genes. MCS, sitios de clonamiento múltiple. Fuente: Tirabassi, 2012.

2.7 Transformación bacteriana

Se entiende por transformación a la transferencia de información genética hacia una bacteria receptora a través de una molécula de ADN, la cual puede hallarse libre en el medio producto de la lisis celular de otra bacteria. A diferencia de la conjugación y de la transducción, los otros dos mecanismos de la transferencia génica horizontal, para que ocurra la transformación, solo se requiere de la disposición por parte de la bacteria receptora de aceptar ADN. Esta habilidad es referida como el estado de competencia. (Betancor *et al.*, 2008). La competencia natural ocurre en un grupo de especies de bacterias que tienen la capacidad de tomar el ADN lineal o a veces circular. Como la competencia natural es restringida solo para unas especies es de gran importancia en los procedimientos de genética bacteriana contar con métodos para la inducción del estado de competencia en bacterias no naturalmente transformables. Entre los métodos de inducción para la transformación de *E. coli* están los que basan con sustancias químicas, estos trabajan con la apertura de poros en la membrana plasmática por tratamientos con cationes polivalentes e incubación a baja temperatura, luego cortos periodos de calor y shock iónico resultan en un rápido flujo entrante de medio extracelular, más tarde la recuperación de la bacteria en medios ricos no selectivos aseguran su viabilidad. Por otro lado, la transformación usando electroporación presenta ventajas resaltantes frente al tratamiento químico, entre ellas la facilidad del procedimiento y la gran eficiencia en la transformación; pero entre sus desventajas está la necesidad de contar con un aparato especializado como es el electroporador (Casali *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

- Implementar una metodología de clonación para la producción de ARNdc en *E. coli* Novablue a partir de genes importantes para el desarrollo de *Prodiplosis longifila* Gagné.

Objetivos específicos

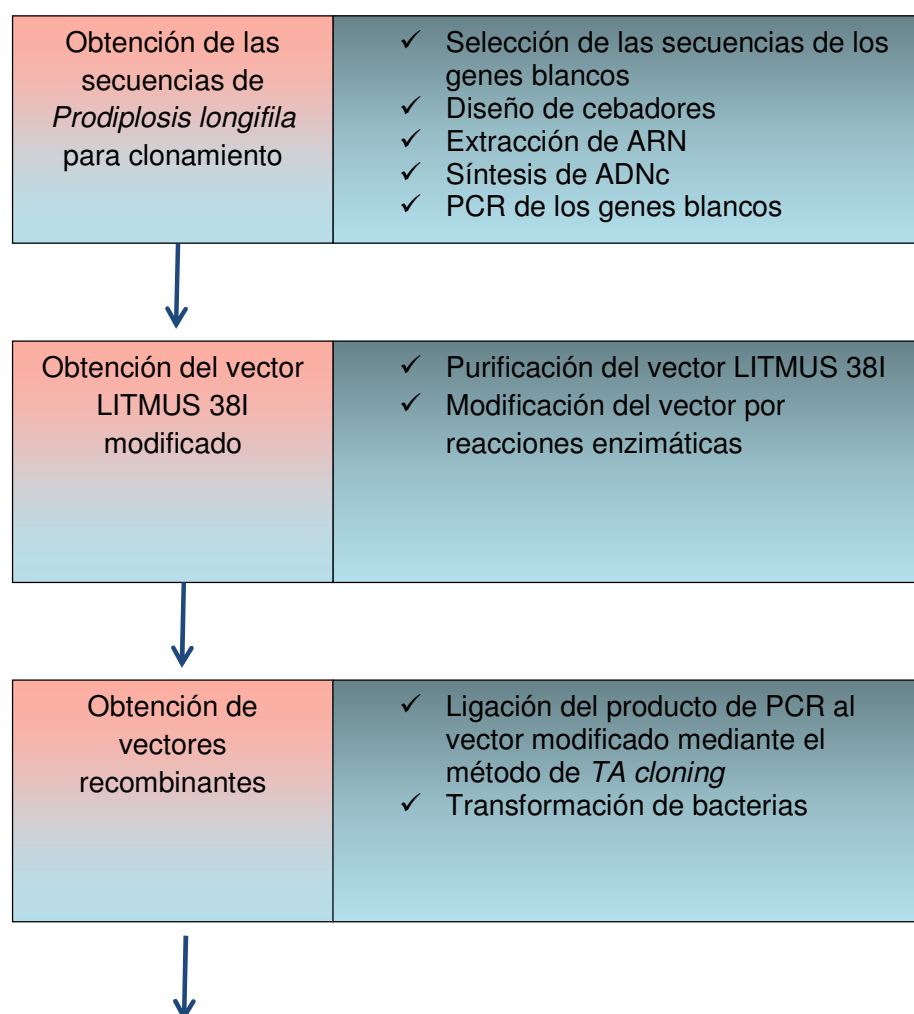
1. Seleccionar genes importantes candidatos para ser silenciados a partir de 5 transcriptomas de *Prodiplosis longifila* Gagné.
2. Diseñar ARN de doble cadena (ARNdc) para su posible uso en extrategias de ARNi.
3. Escoger técnicas de fácil aplicación en laboratorio, que formarán parte de la metodología de clonamiento.

Hipótesis

- La implementación de la metodología de clonación para la producción de ARNdc en bacterias, permitirá obtener vectores recombinantes en poco tiempo y con facilidad, para su posible aplicación en estrategias de ARNi.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

La Figura 7 se muestra un diagrama de flujo de la metodología propuesta.



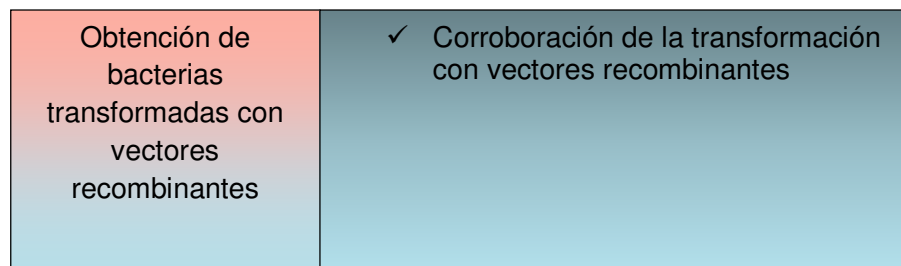


Figura 7. Diagrama de flujo general de los pasos metodológicos

4.1 Selección de las secuencias de los genes blancos

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de genes a partir de los transcriptomas ensamblados y anotados de los 5 estadios (larva I, larva II, larva III, adulto hembra y adulto macho) de *Prodiplosis longifila*. Estos transcriptomas fueron provistos por las entidades asociadas del proyecto: “CONTROL DEL ATAQUE DEL DÍPTERO *Prodiplosis longifila* DEL CULTIVO DE ESPÁRRAGO (*Asparagus officinalis*) MEDIANTE LA INGESTA DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE dsARN DIRIGIDOS A GENES IMPORTANTES EN SUS DIFERENTES ESTADIOS”, financiado por el Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad (FIDECOM) del Estado Peruano.

Los transcriptomas provienen de un secuenciamiento de RNA-seq por *University of Miami Miller School of Medicine* (EE.UU.) y de un paso de normalización de secuencias realizado por EVROGEN (Rusia).

Las secuencias de 10 genes de *P. longifila* fueron escogidos, de acuerdo a la descripción de su anotación. Se escogió a los que describían en su anotación, a los genes propuestos a silenciar en *Drosophila melanogaster*. en el reporte de Boutros *et al.* (2004), luego de evaluar 19,470 ARNdc para silenciamiento. Una vez obtenidas las secuencias se procedió a buscar regiones homólogas de al menos 19 nucleótidos en todas las otras secuencias de la base de datos transcriptómica de *P. longifila*. Para tal fin se realizó la búsqueda con el

programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) en el que se modificó el tamaño de palabra de búsqueda del algoritmo del BLASTN. Obtenido los resultados del BLASTN, se procedió a limitar las regiones de las secuencias que pueden ser utilizadas posteriormente en la tecnología del ARNi y por lo tanto en el clonamiento. Aquellas regiones que presentaban un 100% de identidad de al menos 19 nucleótidos con otra secuencia diferente de la base de datos, fueron excluidas, de modo que por cada secuencia blanco se obtuvo diferentes amplicones posibles.

4.2 Diseño de cebadores

Los cebadores para cada posible amplicón de los genes blancos fueron diseñados con el servicio en web de la herramienta E-RNAi (Horn y Boutros 2010) disponible en: <https://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>, en el que se estableció los siguientes parámetros principales: temperatura de fusión = 50 – 60 °C, contenido GC > 50%, longitud del amplicón = 200 – 600 nucleótidos. Por cada secuencia blanco se procuró obtener dos diseños de cebadores, lo cuales preferiblemente producían distintos amplicones. Los cebadores fueron enviados a IDT (Integrated DNA Technologies) para su síntesis.

4.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se recibieron larvas de *P. longifila* de criaderos de CAMPOSOL trasladados con hielo seco. El ARN se aisló con el reactivo TRIZOL (SIGMA), con algunas modificaciones del protocolo del producto. Aproximadamente 100 mg de tejido fueron pulverizados con nitrógeno líquido en morteros, el polvo fue colocado en tubos de 1.5 mL y se le agregó 1 mL del reactivo TRIZOL para luego homogenizar el contenido con una jeringa estéril. Los tubos se centrifugaron a 4 °C, 14000 rpm por 10 min., y los sobrenadantes se colocaron en tubos nuevos para colocarles 200 µL de cloroformo. Se homogenizó el contenido y se centrifugaron los tubos a 4 °C, 14000 rpm por 15 min. Los sobrenadantes se colocaron en

tubos nuevos y se les añadió 500 µL de isopropanol frío. Se los dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min., luego se centrifugaron a 4 °C, 14000 rpm por 10 min. A los pellets obtenidos se les realizó dos lavados consecutivos con etanol al 80% y 70% respectivamente. Se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min los tubos, luego los pellets fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas tratada con DEPC (dietilpircarbonato) al 2%. Aquellas muestras que mostraron las relaciones de absorbancia de 260/280 y/o 260/230 menor a 1.8 fueron extraídas nuevamente con 2 pasos de ácido-fenol-cloroformo (5:1 v/v). El ARN total fue resuspendido en 50 µL de agua. La calidad final del ARN fue determinada por espectrofotometría y electroforesis. El primero se realizó en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y el segundo mediante un gel de agarosa al 1 % con tampón TAE 1X (Tris-acetato), y tinción con bromuro de etidio y con tampón de corrida TAE 1X. 5 µL de cada una de las muestras de ARN se corrieron en el gel a 90 V por 1 hora y su visualización se realizó con luz UV. Los ARN extraídos fueron tratados con el producto DNase I recombinant, RNase-free (ROCHE), siguiendo las especificaciones del fabricante. A partir de este ARN, limpio e íntegro, se sintetizó ADNc (ADN complementario) con el kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo del fabricante. Para la síntesis se utilizó una mezcla de oligo “dT primers” y “random primers” proporcionados por el kit.

4.4 PCR de los genes blancos

Se procedió a generar los amplicones a clonar, por PCR. Para tal fin, se realizó la PCR con los cebadores diseñados y sintetizados. Se seleccionó aquellos cebadores que daban una adecuada amplificación a 54 °C. La polimerasa que se usó fue la Taq DNA Polymerase, recombinant (Thermo Fisher Scientific), los dNTPs y MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific). La concentración de los componentes y el ciclaje de la PCR se muestran en la Tabla 2A y 2B,

respectivamente. Debido a que se necesitaba la adición de la adenina en los extremos de los amplicones, el paso de la extensión final de la PCR fue de 10 minutos.

Como paso inicial, para corroborar la adecuada reacción de polimerización a partir de ADNc y concentración del ADNc óptima, se realizó una PCR (volumen final 10 μ L) con los cebadores sintetizados de 3 secuencias de los genes blancos seleccionados: 1.1, 4.1 y 5.1. Luego, se llevó a cabo la PCR de los demás genes a un volumen final de 50 μ L. Las reacciones de PCR obtenidas fueron purificadas con el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Para visualizar los productos de la PCR, 4 μ L de la reacción de PCR purificada, fueron cargados en un gel de agarosa al 1.5% a 90 V por 1 hora.

Tabla 2. Componentes (A) y ciclaje (B) de la reacción de PCR de las secuencias de los genes a clonar

A.

| Reactivo | Cantidad por reacción (μ L) | Concentración final |
|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Agua libre de nucleasas | Variable | - |
| Tampón de reacción de PCR 10X | 5 | 1X |
| Mix dNTP (2 mM cada uno) | 5 | 0.2 mM c/u |
| Cebador sentido (10 μ M) | 12.5 | 2.5 μ M |
| Cebador antisentido (10 μ M) | 12.5 | 2.5 μ M |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2.5 | 2.5 mM |
| ADNc | Variable | 5 ng |
| <i>Taq</i> polimerasa (5 U/ μ L) | 0.5 | 2.5 U |
| Volumen total | 50 | |

B.

| Paso | Temperatura °C | Tiempo | Número de ciclos |
|----------------------|----------------|--------|------------------|
| Denaturación inicial | 94 | 3 min | 1 |
| Denaturación | 94 | 30 s | 38 |
| | 25 | | |

| | | | |
|------------------|-------|--------|---|
| <i>Annealing</i> | 54-58 | 30 s | |
| Extensión | 72 | 45 s | |
| Extensión final | 72 | 10 min | 1 |

4.5 Extracción del vector Litmus 38i

Se eligió el vector Litmus 38i para la producción de ARNdc. Entre los sitios de restricción con los que cuenta están para las enzimas *EcoRV* (GAT[^]ATC), *BamHI* (G[^]GATCC), y *HindIII* (A[^]AGCTT). La primera enzima se utilizó para modificar el vector y las dos últimas para corroborar la presencia del inserto, como se detalla más adelante.

El vector Litmus 38i fue extraído a partir de células DH5 α previamente transformadas y que fueron proporcionadas por la empresa CAMPOSOL S.A. Inicialmente se probó dos metodologías para la extracción: por lisis alcalina y con el kit GenElute™ Plasmid Miniprep (SIGMA). Finalmente se eligió este último para el establecimiento de la metodología de producción del ARNdc. Los protocolos de la extracción se muestran a continuación:

4.5.1 Extracción por lisis alcalina

Los tubos con cultivos de células DH5 α transformadas, con 1.5 mL de medio, crecidos durante toda una noche, se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante de cada tubo y el pellet obtenido se resuspendió en 100 μ L de tampón de resuspensión (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl a pH 8.0, 10 mM EDTA a pH 8.0) que se enfrió previamente y al que se le colocó la ARNasa A a 10 mg/mL; estos tubos fueron colocados en hielo por algunos minutos. Luego, la mezcla fue colocada en tubos de 1.5 mL, y se le añadió 200 μ L de la solución de lisis (0.2 N NaOH, 1% wt/vol de SDS). Los contenidos se mezclaron invirtiendo los tubos varias veces y se los dejó reposar nuevamente en hielo por 5 minutos. Pasado el tiempo, se les agregó 150 μ L de la solución de neutralización (3 M acetato de potasio a pH 4.8) que estaba previamente enfriada. Nuevamente se

homogenizó los contenidos invirtiendo los tubos varias veces y se los dejó en hielo por 5 min. Luego, los tubos fueron centrifugados a 14000 rpm por 5 min a 4 °C y los sobrenadantes obtenidos se pasaron a tubos limpios. Para obtener el vector, se agregó dos volúmenes de etanol al 95% a temperatura ambiente y se mezcló los contenidos invirtiendo suavemente los tubos. A continuación, se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 30 min., para obtener el pellet. Se descartó los sobrenadantes y se realizó dos lavados con 1 mL de etanol al 70 %, centrifugándolo a 14000 rpm por 5 min., en cada lavado. Se descartó el sobrenadante de cada tubo y el pellet fue secado a temperatura ambiente, luego el pellet fue resuspendido en 50 µL de tampón TE (100 mM Tris, 10 mM EDTA a pH 8.0)

4.5.2 Extracción con kit

Se extrajo el vector a partir de cultivos de 3 mL de células DH5α transformadas. Se siguió las indicaciones del protocolo del fabricante del kit GenElute™ Plasmid Miniprep (SIGMA): se centrifugaron los tubos con los medios a 5000 rpm por 5 min. Se descartó los sobrenadantes y los pellets fueron resuspendidos en 200 µL de “solución de resuspensión”. El contenido se pasó a tubos, los cuales se mezclaron por inversión, luego se agregaron 200 µL de la “solución de lisis” a cada tubo, se mezclaron nuevamente por inmersión; se añadieron 350 µL de “solución de neutralización”, y se mezclaron suavemente. Las mezclas se depositaron en las columnas de unión preparadas y se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 1 min. Luego se transfirió cada columna a un nuevo tubo y se añadieron 50 µL de “solución de elución”. Se centrifugaron los tubos por 1 min a 14000 rpm, y se colectó el vector.

La cantidad y calidad del vector extraído fueron determinados por espectrofotometría (Nanodrop 1000 - Thermo Fisher Scientific) y electroforesis (gel al 1% de agarosa con tampón TAE 1X, y tinción con bromuro de etidio y con tampón de corrida TAE 1X. Las muestras de vector se corrieron en el gel a 90 V por 1 hora.

4.6 Modificación del vector

4.6.1 Linearización del vector

Para realizar las modificaciones al vector, éste debe encontrarse linearizado. Para tal fin, 3 µg del vector Litmus 38i purificado son digeridos con 3 U de *EcoRV* (Eco32I – Thermo Scientific) en 30 µL de reacción por 1 hora a 37 °C, siguiendo las especificaciones del producto. La enzima de digestión fue inactivada por la purificación de la reacción con el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific).

4.6.2 Adición de timina al vector

La adición del nucleótido de timina al vector se realizó para poder clonar por *TA cloning* los productos de PCR que presentaban la adenina adicional en los extremos. Para tal fin, dos métodos se ensayaron, el primero por reacciones de PCR y el otro por reacciones con la enzima terminal transferasa.

- Por método de PCR

Para 20 µL, 1µg de plásmido fue amplificado con 1U de enzima *Taq* polimerasa (Thermoscientific) por 2 horas a 72 °C. Luego el vector fue purificado con el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermos Scientific). Las concentraciones de los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para la modificación del vector

| Reactivo | Cantidad por reacción (µL) | Concentración final |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------|
| Agua libre de nucleasas | Variable | - |
| Tampón de reacción de PCR 10X | 2 | 1X |
| dTP (8 mM) | 5 | 2 mM |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2 | 2.5 mM |
| Vector purificado | Variable | 1µg |
| <i>Taq</i> polimerasa (5 U/µL) | 0.2 | 1 U |

- Por método de transferasa

Para 20 μL , 1 μg de plásmido fue tratado con 20 U de Transferasa (Thermoscientific) a 37 °C por 1.30 horas. Luego el vector fue purificado con el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermos Scientific). Las concentraciones de los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la reacción de transferasa para modificación del vector

| Reactivo | Cantidad por reacción (μL) | Concentración final |
|---|---|---------------------|
| Agua libre de nucleasas | Variable | - |
| Tampón de reacción (5X) | 4 | 1X |
| Vector | Variable | 1 μg |
| dTTP (0.5 mM) | 2 | 50 μM |
| Terminal Deoxinucleotidil Transferasa (20U/ μL) | 1 | 20 U |
| Volumen final | 20 | |

4.6.3 Autoligación del vector

Para confirmar la adición de timina al vector, todo el vector tratado fue autoligado. Para 20 μL , 0.6 μg de vector tratado fue ligado con 1U de T4 DNA ligase (Thermo Scientific), por 24 horas a 14 °C. Luego el ADN fue visualizado en un gel de agarosa al 1 %.

4.7 Ligación del producto de PCR al vector

Confirmada la adición de timina al vector, el producto de PCR fue ligado al vector en proporción de 3:1, 45 ng de producto de PCR fueron ligados a 15 ng de vector con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific). En la Tabla 5 se muestra los componentes de la reacción. La reacción permaneció a 37 °C por 24 h.

4.8 Obtención de bacterias transformadas con vectores recombinantes

Una vez ligado el producto de PCR al vector, se procedió a obtener bacterias *E. coli* Novablue transformadas con el vector recombinante para lo cual, se indujo la competencia a las células y se siguió con la transformación.

Tabla 5. Componentes de la reacción de ligación del inserto con el vector modificado

| Reactivo | Cantidad por reacción (μL) | Concentración final |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------|
| Agua libre de nucleasas | Variable | - |
| Tampón de reacción de Ligasa (5X) | 4 | 1X |
| Inserto | Variable | 45 ng |
| Vector modificado purificado | Variable | 15 ng |
| T4 DNA ligasa (1 U/μL) | 1 | 1 U |
| Volumen total | 20 | |

4.8.1 Preparación de células quimiocompetentes

La transformación de las células se hizo por el método de shock térmico. Para lo cual se preparó a las células *E. coli* Novablue para que sean quimiocompetentes. Los pasos fueron los siguientes: A partir de un cultivo de 2 mL de las células en medio LB, se tomó 1 mL de cultivo y se colocó en un matraz de 250 mL y se le adicionó 50 mL de medio LB (Anexo 1) y se incubó con agitación a 37 °C durante dos horas. Luego, el matraz se colocó en hielo por 10 min. El contenido fue colocado en tubos de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm, por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se le agregó 20 mL de CaCl₂ a 0.1 M, previamente enfriado, y se mezcló. Luego, se incubó por 15 min en hielo y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de CaCl₂ a 0.1 M con

15% de glicerol y se homogenizó. El contenido se fraccionó en 100 µl en tubos que previamente fueron enfriados en hielo. Las células se guardaron a -70 °C hasta su uso.

4.8.2 Transformación de bacterias

Para la transformación, 5 µL de la solución de vector, que se sometieron a ligación con el producto de PCR, fueron mezclados con 100 µL de células *E. coli* Novablue quimiocompetentes (verificadas previamente su competencia). La mezcla se dejó por 30 min. en abundante hielo, luego, se incubó a 40° C por 45 segundos, para colocarlo en hielo por algunos minutos. Pasado todo este proceso, a la mezcla se le añadió 500 µL de caldo SOC (Anexo 1) y se incubó por una hora con agitación fuerte. Luego, se centrifugó a 6000 rpm por 5 min. El pellet fue resuspendido en 100 µL de caldo SOC. 100 µL de esta suspensión fueron sembrados en placas con agar LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL), IPTG (0.1 mM) y X-Gal (40 µg/mL). Las placas se dejaron por 24 horas a 37 °C.

4.8.3 Verificación de la presencia del inserto

La verificación de la presencia del inserto en las bacterias transformadas *E. coli* Novablue se realizó a través de reacciones de PCR. Para lo cual, primero se extrajo el vector (con el kit miniprep-SIGMA) de los clones seleccionados. Para la PCR, 5 ng del vector extraído, fueron usados en un volumen final de 10 µL, con las mismas condiciones a la que fue amplificado el gen para clonar (ver Tabla 2).

Adicionalmente, para la verificación de la presencia del inserto en el vector, algunos vectores recombinantes fueron utilizados para una simple y doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Los componentes de la reacción se observan en la Tabla 6. Las reacciones fueron incubadas a 37° C por 2.5 h.

Los resultados de ambos métodos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%.

4.9 Almacenaje de las bacterias transformadas

Una vez confirmada la transformación con vectores recombinantes, las bacterias fueron cultivadas hasta llegar a su fase *log* (4 a 6 h aprox.), y fueron almacenadas a -80 °C en 15 % de glicerol.

Tabla 6. Componentes de la reacción de digestión con el vector clonado

| Reactivo | Cantidad por reacción (μL) | Concentración final |
|---|----------------------------|---------------------|
| Agua libre de nucleasas | Variable | - |
| Tampón de reacción NEBuffer 3.1 (10X) | 2 | 1X |
| Vector clonado | Variable | 100 ng |
| Enzima de restricción <i>Bam</i> HI (20 U/μL) (simple digestión) y <i>Hind</i> III (20 U/ μL) (doble digestión) | 0.5 | 5U c/u |
| Volumen total | 20 | |

5 Resultados

5.1 Obtención de cebadores de los genes blancos

A partir del transcriptoma ensamblado y anotado de *P. longifila* se escogió los genes blancos y las regiones posibles de esos genes para la obtención de los fragmentos de ADNc para clonar. En la Tabla 7 se muestra los cebadores obtenidos de las regiones escogidas para el establecimiento de la metodología de *TA cloning*. Los amplicones generados por estos cebadores se muestran en el Anexo 2.

Tabla 7. Cebadores de las secuencias de genes utilizados

| Nº designado | Secuencia del cebador (5' -> 3') | | Gen blanco |
|--------------|----------------------------------|---|---|
| 1.1 | F R | GGCAAAACCATCATTTTTGG CACTTGTTGGTGTGGAACG | <i>Small bristles</i> |
| 3.1 | F R | GTGCCCATTTCCTTCGTTTCAT AATTCGGCATCGAAAAACAC | <i>Diminutive</i> |
| 4.1 | F R | CAACACCGACATCCACAAAA CATTGCCAAGTCGTTCTTGA | <i>oo18 RNA-binding protein</i> |
| 5.1 | F R | TTGTTTCGTTTCAGAGTCACCG TTGCTGCTTGACATTTTCGTC | <i>Membrane protein involved in Golgi transport</i> |
| 9.1 | F R | TGACCACTGTATCGGTTGGA GCCACAACGTCAACATGAAC | <i>Translation initiation factor</i> |
| 13.1 | F R | ACAGGTGCCATTGATGTGAA TTGTTGGCATTGGTATGGAA | <i>Chloride channel protein EriC</i> |
| 14.2 | F R | CCAATGAATCGACGGCTTTA GGGTATGGCATTGAATTTGG | <i>Bellwether</i> |
| 15.1 | F R | TGTGTCACGCAAATCCAAAT GGAATTTCTGGATGGCTTCA | <i>Vesicle coat complex</i> |

| N° designado | Secuencia del cebador (5' -> 3') | | Gen blanco |
|--------------|----------------------------------|---|---|
| 16.1 | F R | TTAGTGAGGCGACAGTGGAA CTGTTGGGAATTCATCGCTT | <i>Actin cytoskeleton organization</i> |
| 17.1 | F R | TTTCGGATAAAAAGGCATCG TTCGCTAAAATTGATGATCGG | <i>Ubiquitin fusion degradation protein 2</i> |
| 18.1 | F R | TCCAAAATGAAAATCGCACA AACACATCGCCACAACAAA | <i>Negative regulator of transcription</i> |
| 18.2 | F R | TTCATATTGCGCGTACTTCG CATTGCTTGTGCTTGCTGT | <i>Regulatory particle non-ATPase 3</i> |
| 21.2 | F R | AGAATTCGGCAAATGTCACC GATCCAGAAAATAACGGCGA | <i>Female sterile (2) ketel</i> |
| 22.1 | F R | GAGCATCGTAGTGCAACCAA TTTGCTGAAAATGTGTCCCA | <i>Noisette</i> |
| 25.1 | F R | CCACCGTCCAGCTTACATTT ACCAGACGGACCATTACCA | <i>Caudal</i> |
| 37.1 | F R | TAATGGTCTTAGCGGCAACC CATTTTCGCGGGCATTATAC | <i>Microtubule-severing ATPase activity</i> |
| 39.1 | F R | ATCGGCAGCTGATTGAAGTT GAATGTTCAACGCCAAACAC | <i>Nejire</i> |
| 40.1 | F R | ACGAAAAATGGATGCGATT CAAGGAACAATTTGGCGAGT | <i>Histone acetyltransferase</i> |
| 41.1 | F R | CGAAGCGGAACGTAACAAAT CCAGATTTTGCACTTCATTG | <i>SNAP receptor activity</i> |
| 45.1 | F R | TGCCTTTGCTATTCCTCTGG TGATAAAGGGACGTTTCCAA | <i>Microtubule-binding protein involved in cell cycle control</i> |

Nota: F, cebador sentido (*forward*); R, cebador antisentido (*reverse*)

5.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

En la extracción del ARN total de las larvas de *P. longifila* se presentaron algunos problemas con el reactivo TRIZOL (SIGMA), entre los cuales se tuvo: dificultad para pulverizar las muestras con nitrógeno líquido, debido a que las larvas presentaron alto porcentaje de agua corporal, por lo que no se pudo pulverizar completamente las muestras, fue necesario homogenizarlas con una jeringa hipodérmica con el reactivo de TRIZOL; además el ARN extraído de algunas muestras estaba contaminado, como se puede observar en la relación 260/280 y 260/230 en los espectros de dos de las tres muestras en la Figura 8 . Aquí se

observa que en la muestra “2” y “3” la relación 260/280 está lejana al valor de 2, este resultado se interpreta que existe contaminación de proteínas en el ARN extraído. En la muestra 3, la relación 260/230 también está lejano a 2, mostrando la contaminación probablemente por sales. La corrida electroforética de estas muestras se observa en la Figura 9. Debido a que se pudo obtener buena cantidad de ARN (más de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por cada extracción, en las muestras contaminadas se realizó una nueva extracción, con lo que se mejoró notablemente la pureza.

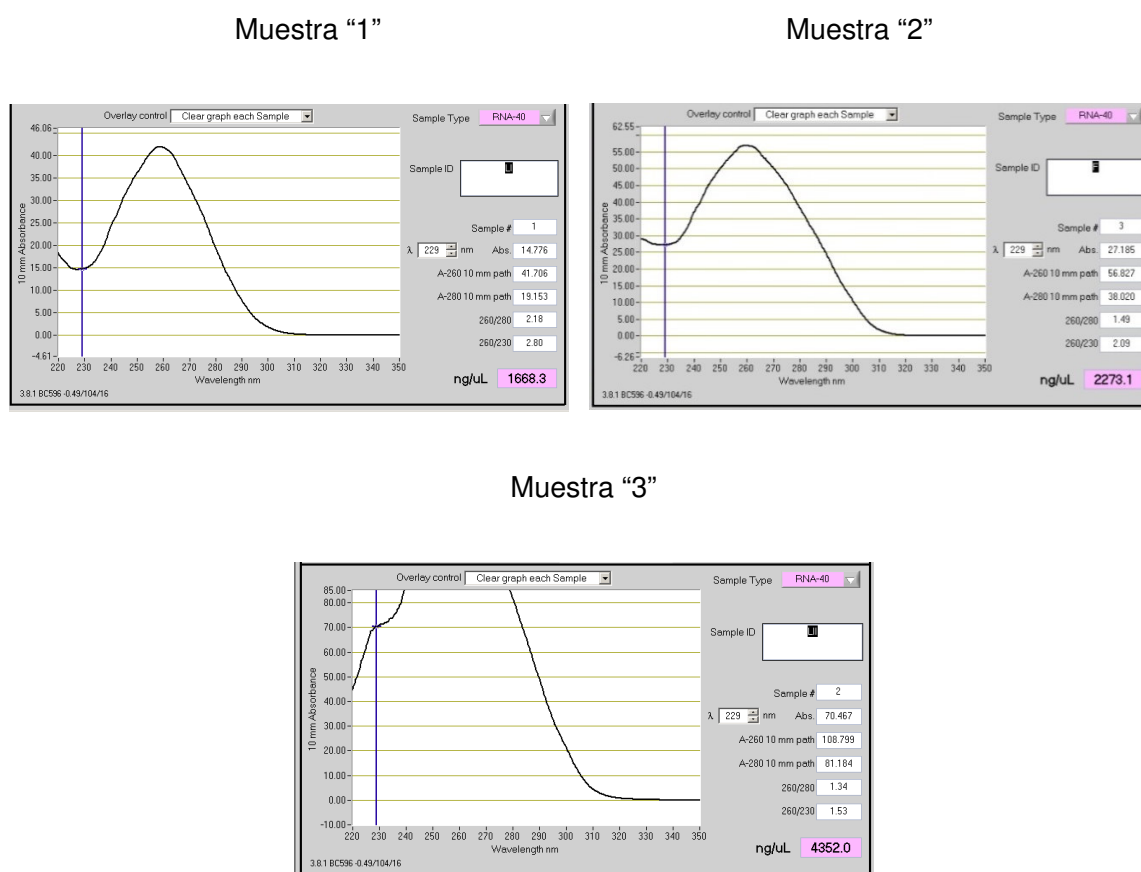


Figura 8. Medidas espectrales del ARN total aislado de larvas de *P. longifila*.

El ARN total de las muestras 1, 2 y 3 de *P. longifila* fue resuspendido en 50 μL de agua libre de nucleasas.

El ARN total obtenido de las larvas se muestra en la Figura 9. Se puede observar una banda de mayor intensidad, de un tamaño mayor a 1Kb, y otras bandas diferenciadas de bajo peso

molecular. En ningún caso se observan manchas corridas o *smear*, que se presenten desde el inicio del pocillo, y tampoco ni una banda de gran concentración de bajo peso molecular, lo que denota la alta integridad del ARN extraído.

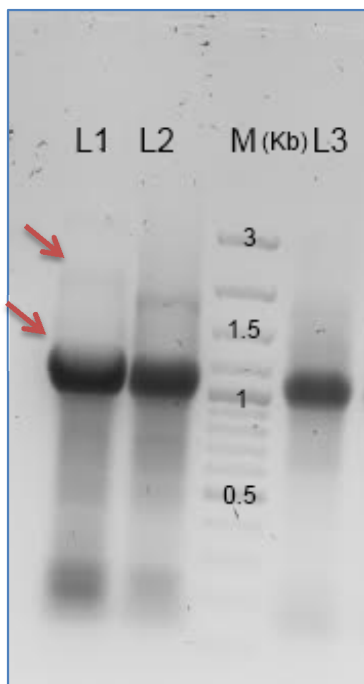


Figura 9. Gel de agarosa al 1% con muestras de ARN total de larvas de *P. longifila*. ARN total extraído de muestras de larvas. L1, L2 y L3 corresponden a la muestra 1, 2 y 3 respectivamente. M., -marcador de 100 pb (Fermentas). Las flechas indican las principales bandas del ARN ribosómico (1.2 Kb y 2 Kb aprox.)

Las PCR iniciales con los 3 cebadores: 1.1, 3.1, 4.1 y con el ADNc sintetizado a partir del ARN extraído de las larvas, se muestran en la Figura 10. Se puede observar tres bandas, pertenecientes a los amplicones de cada cebador, con el tamaño esperado (aproximadamente 500 pb). Estos amplicones fueron específicos, ya que no se observa otra banda definida de más de 100 pb. También se observa bandas tenues de menos de 100 pb, correspondientes a los dímeros de cebadores. El blanco, que es la reacción al que se le colocó el control negativo de la transcripción reversa, no amplificó.

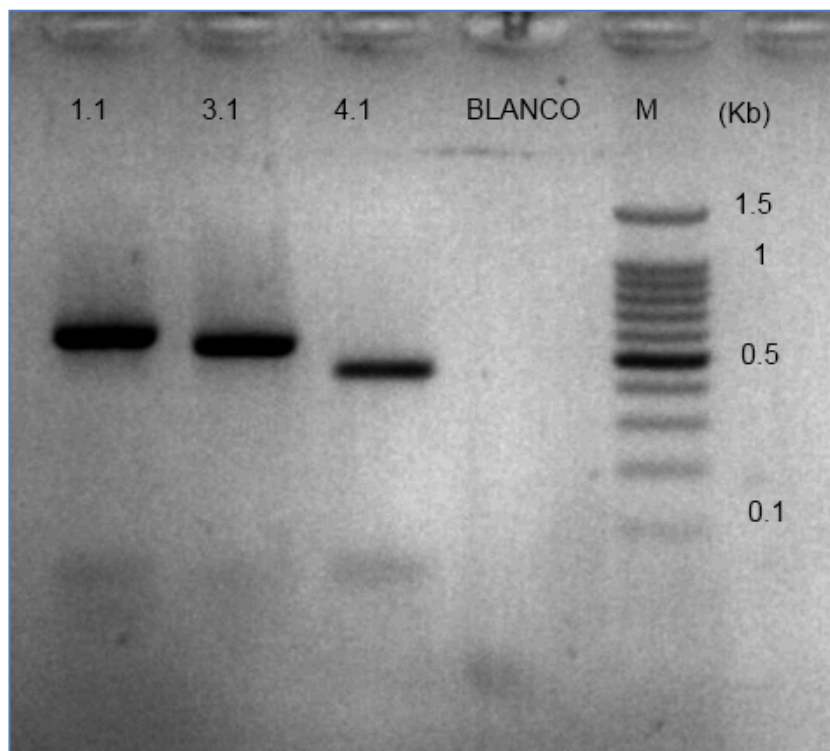


Figura 10. Gel de agarosa al 1.5% con los amplicones del ADNc de *P. longilia*. 1.1, 3.1 y 4,1 son las reacciones de PCR realizados con los cebadores del mismo nombre. Blanco, PCR realizado con el control negativo de la reacción de síntesis de ADNc. M., marcador de 100 pb (PROMEGA).

5.3 PCR de los genes blancos

Las reacciones de PCR con 16 cebadores seleccionados que amplificaban a 54 °C se muestran en la Figura 11. Hubo amplificación, con el tamaño esperado, para 15 de los 16 genes mostrados. Además, los productos de PCR están debidamente purificados, ya que no se observa dímeros de cebadores.

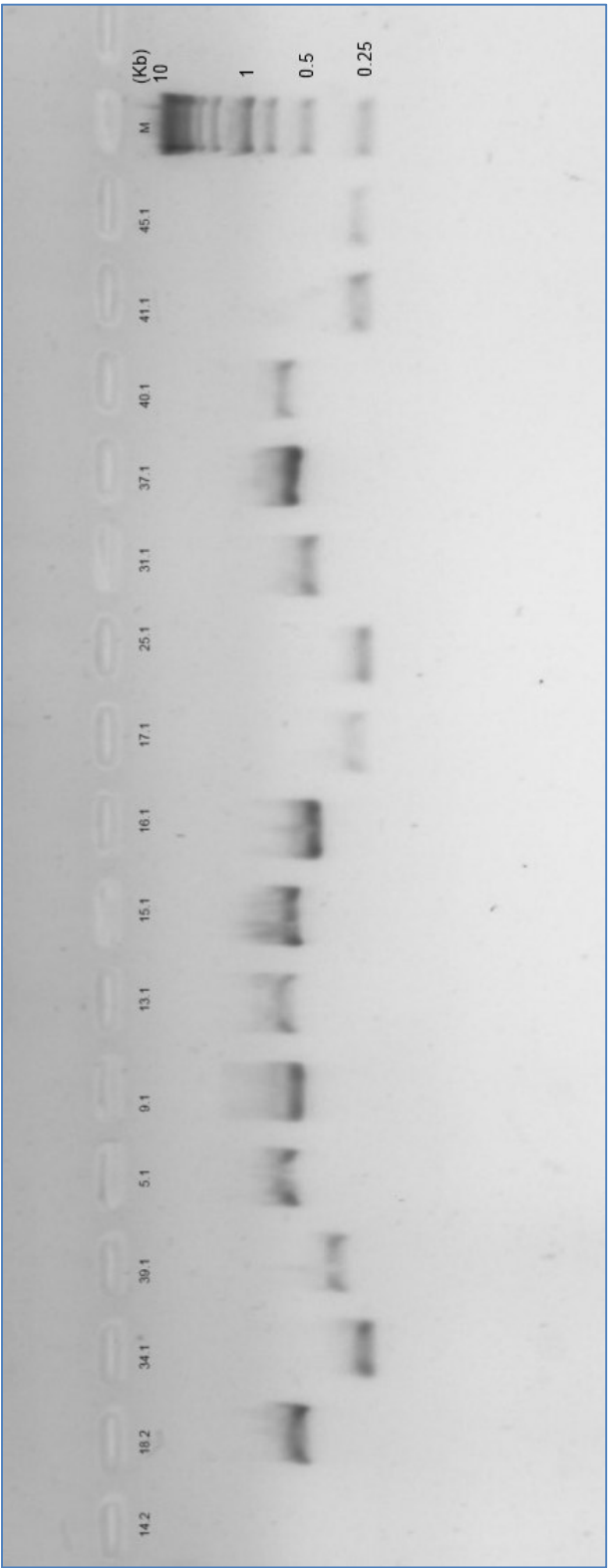


Figura 11. Gel de agarosa al 1.5% con los amplicones de 16 genes corresponden a 16 genes blancos. Los números corresponden a 16 genes blancos, como se han asignado en la Tabla 7. M., marcador de 1Kb (Fermentas).

5.4 Obtención del vector Litmus 38i modificado

5.4.1 Extracción del vector Litmus 38i

Las lecturas con el espectrofotómetro Nanodrop, del ARN extraído con el método de lisis alcalina y con el de kit, de 10 cultivos (5 por cada método), se muestra en la Tabla 8. Como se observa, con el kit se presentó menos contaminación al presentar mejores índices de la relación 260/280 y 260/230, ambos más cercanos a 2, comparado con las muestras extraídas por lisis alcalina. Si bien la extracción por lisis alcalina presentó mayor cantidad de ácidos nucleicos, sin embargo, el vector se aisló con otros tipos de ácidos nucleicos. En las Figuras 12 y 13 se muestran las fotos de los geles de electroforesis de la extracción con ambos métodos. Para ambos geles se puede observar la presencia de las bandas correspondiente a las principales estructuras del vector, de aproximadamente 2000 y 4000 pb, sin embargo, la extracción con lisis alcalina presentó otras bandas contaminantes de diferentes pesos moleculares. Este problema no se observó al utilizar el kit, por lo que este tipo de extracción fue escogido en nuestra metodología de clonación.

Tabla 8. Lecturas en el espectrofotómetro del vector Litmus 38i purificado
1L, 2L, 3L y 4L, muestras extraídas por lisis alcalina. 1K, 2K, 3K y 4K, muestras extraídas por Kit miniprep (SIGMA)

| Muestra | Concentración (ng/μL) | 260/280 | 260/230 |
|---------|--------------------------|---------|---------|
| 1L | 2045 | 1.7 | 1.7 |
| 2L | 1598 | 1.2 | 1.5 |
| 3L | 3400 | 1.9 | 1 |
| 4L | 2581 | 0.7 | 0.8 |
| 5L | 872 | 1.5 | 1.9 |
| 1K | 111 | 1.9 | 2.5 |
| 2K | 132 | 1.95 | 2.6 |
| 3K | 137.9 | 1.92 | 2.3 |
| 4K | 127.1 | 1.9 | 2.5 |
| 5K | 105 | 1.5 | 1.7 |

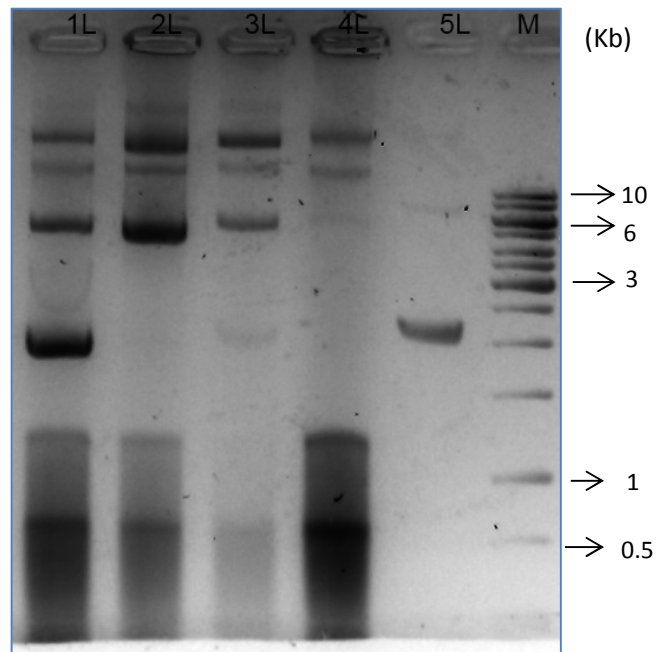


Figure 12. Gel de agarosa al 1% con el vector Litmus 38i extraído por lisis alcalina. 1L, 2L, 3L, 4L Y 5L, muestras diferentes de extracción. M, marcador de 1 Kb (Fermentas).

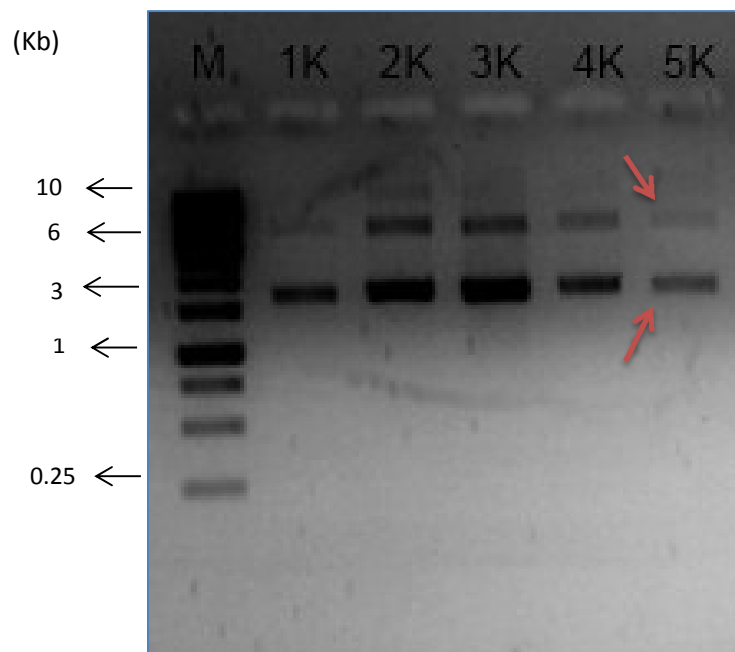


Figura 13. Gel de agarosa al 1% con el vector Litmus 38i extraído por el Kit. 1K, 2K, 3K, 4K y 5K, muestras diferentes de extracción. M, marcador de 1 Kb (Fermentas). Las flechas rojas indican las bandas esperadas (2 Kb y 4 Kb aprox.).

5.4.2 Modificación del vector

Los primeros ensayos de transformación, que se realizó con el vector modificado y ligado a la secuencia del gen, dieron como resultado un escaso número de colonias blancas (recombinantes), por lo que se decidió realizar una autoligación del vector modificado, sin ligar al gen, para observar su recircularización y por lo tanto la corroboración de la falta de éxito de la modificación del vector. En la Figura 14 se muestra un gel de electroforesis con vectores linearizados, modificados y que han sido autoligados. Se observa una sola banda de aproximadamente 2800 pb. Es decir, a la vista no se observa las conformaciones estructurales del vector recircularizado.

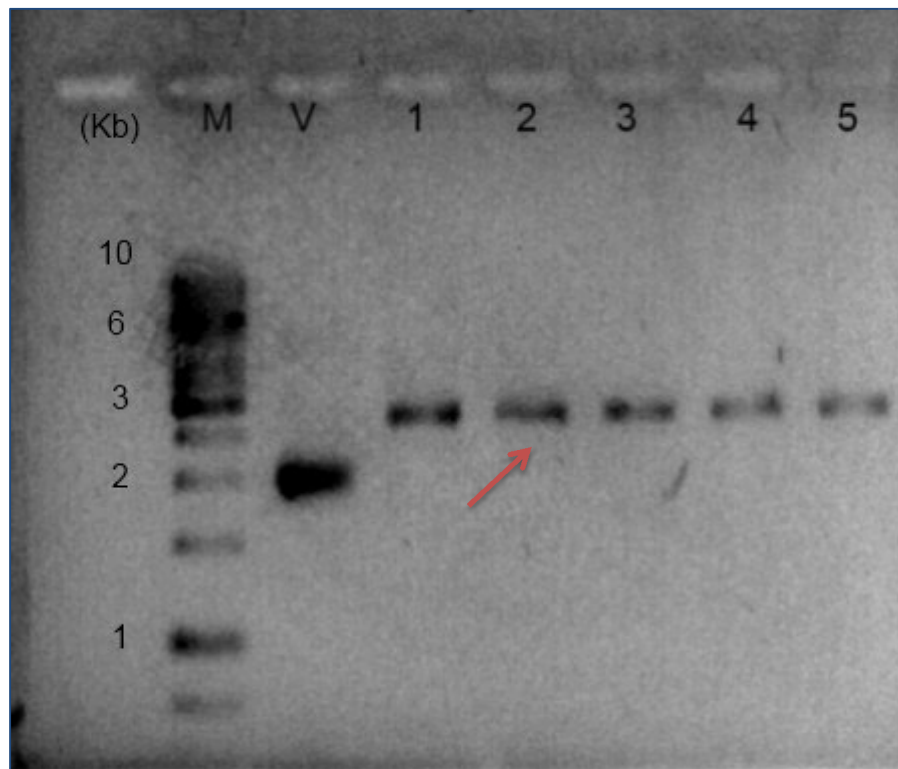


Figura 14. Gel de agarosa al 1% con vectores modificados autoligados. V, vector Litmus 38i sin modificación. 1,2,3,4, y 5 vectores provenientes de autoligación de vectores modificados. M, marcador de 1Kb (Fermentas). La flecha roja indica las bandas esperadas (3 Kb aprox.).

5.5 Transformación de células *E. coli* Novablue

Obtenido el vector modificado por ambos tratamientos se pasó a ligarlos a los productos de PCR que presentaban la adenina adicional en sus extremos. Luego, los productos fueron transformados a células *E. coli* Novablue quimiocompetentes. En las Figuras 15 y 16 se muestran placas de agar con colonias de bacterias transformadas a partir de vectores modificados por PCR y a partir de vectores modificados por la enzima Transferasa, respectivamente. Se obtuvo colonias blancas únicamente con las células *E. coli* Novablue que provinieron de la transformación con el vector recombinante que fue modificado por la enzima Transferasa. Estas células crecieron uniformes, ya que se presentaron colonias de los mismos tamaños y formas. Por lo tanto, la modificación del vector mediante la reacción Transferasa fue elegida para nuestra metodología de producción de ARNdc.

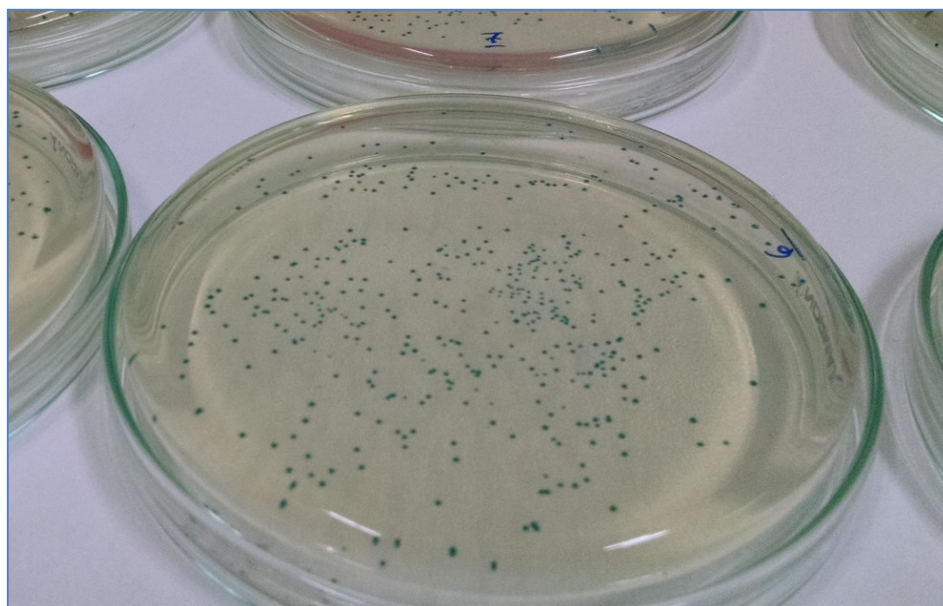


Figure 15. Placa de agar con bacterias transformadas con vectores modificados por PCR. No se observan colonias blancas.

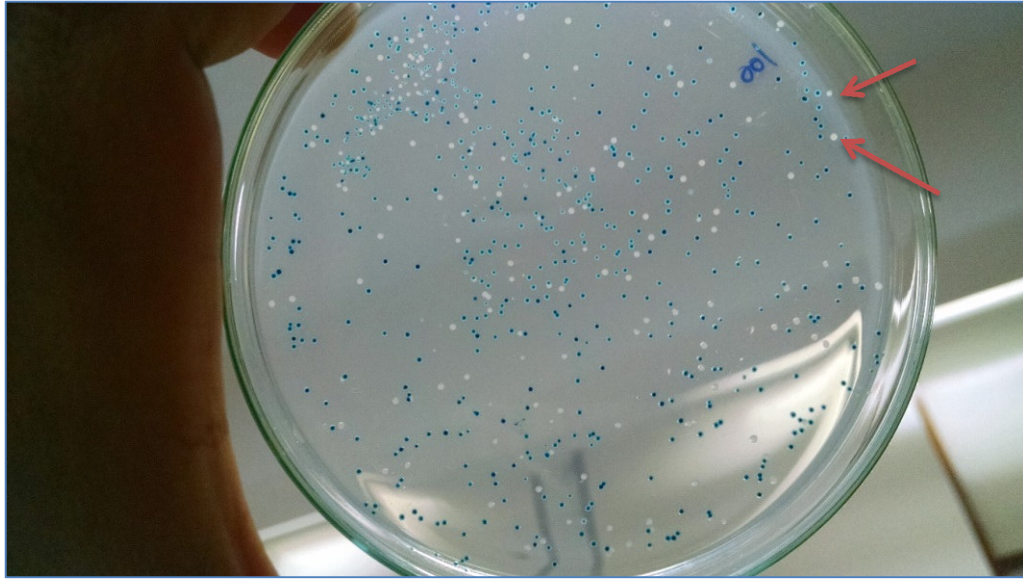


Figure 16. Placas de agar con bacterias transformadas con vectores modificados por reacción de Transferasa. Las flechas indican las colonias con bacterias transformadas.

Un primer intento de verificación del inserto, a partir de las colonias blancas escogidas del producto de la transformación de las células *E. coli* Novablue, se realizó con una PCR usando directamente una porción de la colonia, que se tomó con un palillo mondadiente. Sin embargo, muchos de las PCR no resultaron por lo que se decidió realizar una PCR del vector extraído de esas colonias. Para tal fin, se extrajo el vector de las bacterias crecidas en medio fresco de cada colonia, y se realizó una PCR con los cebadores respectivos, con las mismas condiciones a la que fueron amplificados los genes para ser clonados. En la Figura 17 se muestra el gel de electroforesis en agarosa y se observa que en la mayoría de casos, el amplicón esperado corresponde al tamaño del gen clonado.

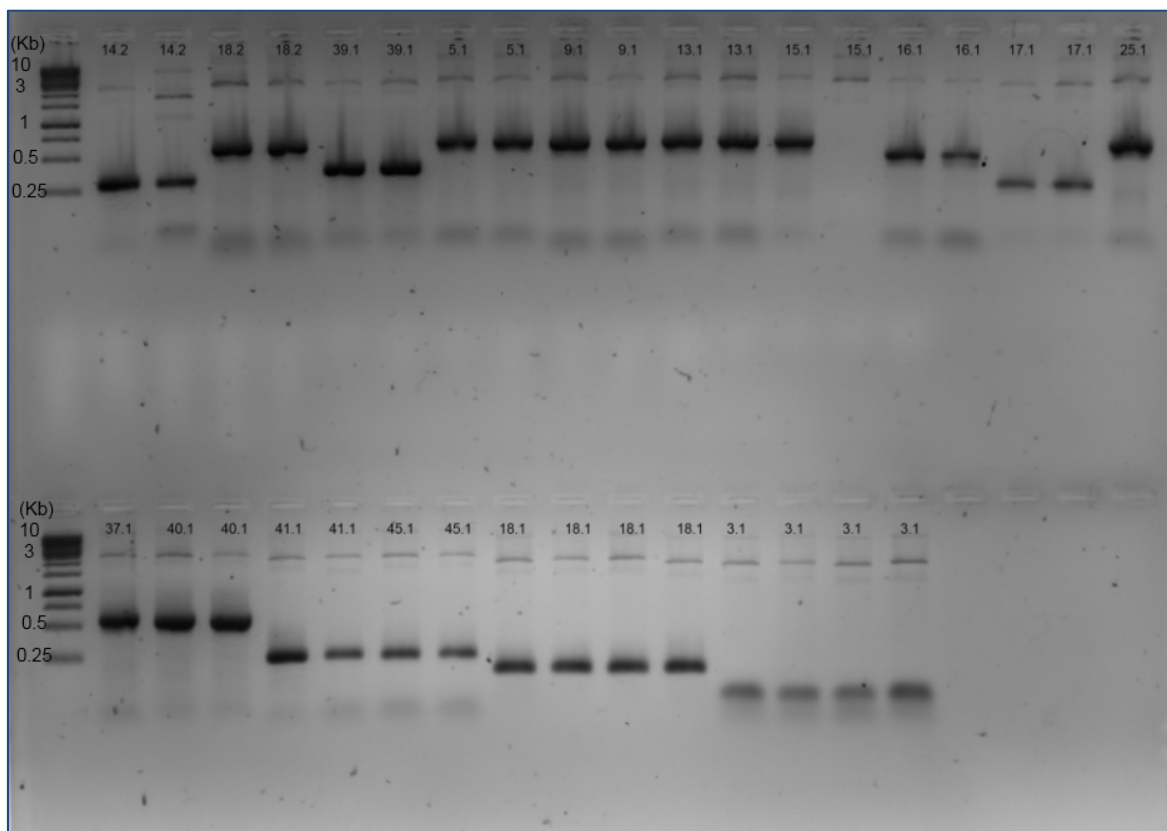


Figure 17. Gel de agarosa al 1.5% con con amplicones a partir de vectores extraídos de bacterias transformadas. Los números corresponden a las PCR realizadas con los cebadores del mismo nombre. M, marcador de 1Kb (Fermentas).

También se observa otras bandas de mayor peso molecular, las cuales corresponden a las 2 típicas estructuras conformacionales del vector, que migran a 2000 y 4000 pb aproximadamente. Para algunos vectores, adicionalmente se realizó una simple y doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. En los geles que se muestran en las Figuras 18 y 19, se cargó: el vector sin digerir, el digerido con una enzima (*Bam*HI), y el digerido por dos enzimas. Se puede observar la presencia del inserto de aproximadamente 500 pb.

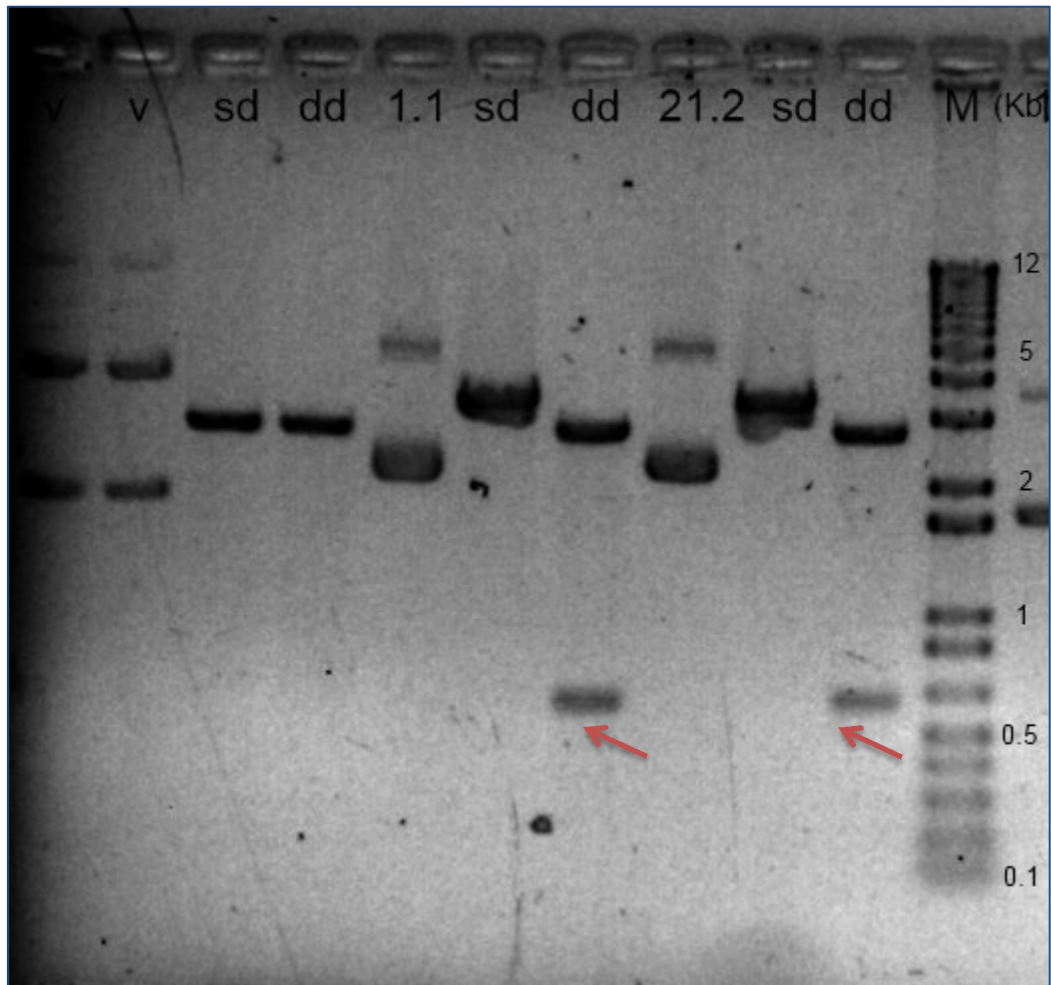


Figure 18. Gel de agarosa al 1.5% con vectores recombinantes de los genes 1.1 y 21.2, sometidos a digestión. Se tiene vectores sin digerir (N° del gen), simple (SD) y doble digerido (DD); extraídos de las bacterias transformadas. M, marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Las flechas indican el inserto liberado.

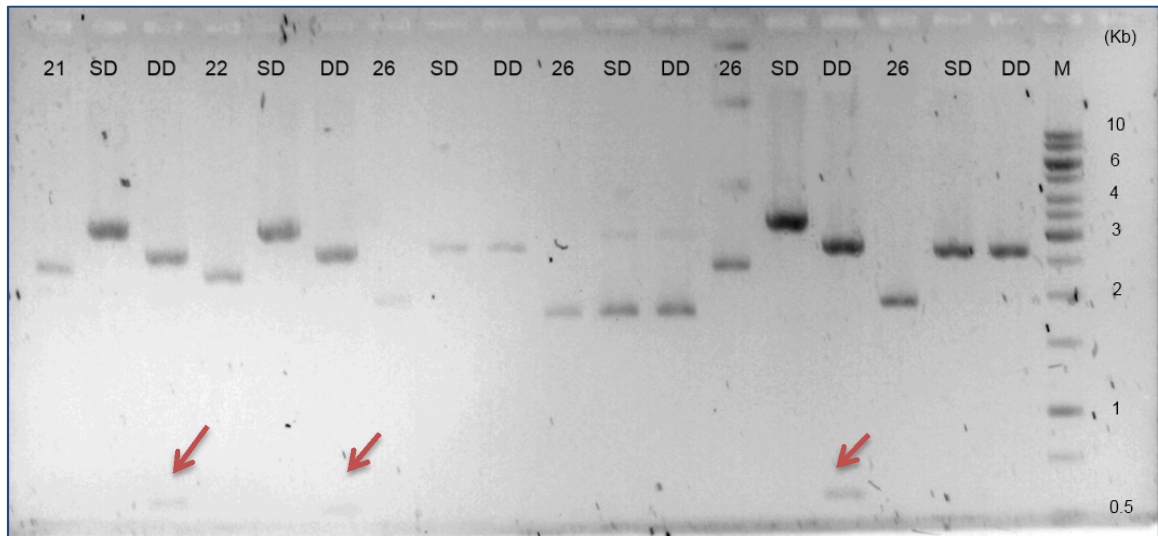


Figura 19. Gel de agarosa al 1.5% con vectores recombinantes de los genes 21.2 y 25.1, sometidos a digestión. Se tiene vectores sin digerir (N° del gen), simple (SD) y doble digerido (DD); extraídos de las bacterias transformadas. M, marcador de 1Kb (Fermentas). Las flechas indican el inserto liberado.

6 Discusión

Para poder realizar el clonamiento, se debía contar con las secuencias a clonar a partir de ARNm de *P. longifila*. Se logró obtener buena cantidad de ARN, sin embargo, este ARN resultó en algunos casos contaminado con proteínas y sales, tal como evidencia los valores del espectrofotómetro en las relaciones 260/280 y 260/230, los cuales están por debajo de 2 (Tabla 8). La contaminación por proteínas pudo haber sido causada por arrastrar proteínas al pipetear la mezcla, luego de la fase de separación de ARN, ADN y proteínas. En el caso de las sales, la contaminación pudo deberse a los insuficientes lavados de alcohol al 75% luego de precipitar el pellet de ARN (Ausubel, *et al.*, 1993). Sin embargo, aun bajo estas condiciones se pudo sintetizar ADNc (Figura 10).

Los resultados de la corrida electroforética de ARN de la Figura 9, muestran que el ARN obtenido presentaba un alto grado de integridad, ya que no se observó *smear* y/o bandas de bajo peso molecular de mayor concentración que las demás. La presencia de una sola banda de alto peso molecular de mayor concentración y no dos, como normalmente se observa al correr ARN total en eucariotas, puede deberse a la co-migración de las subunidades α y β del ARN ribosomal 28S junto con el ARN ribosomal 18S. Este fenómeno ha sido descrito por Winnebeck *et al.* (2010), en este trabajo los autores explican cómo las dos subunidades del ARN ribosómico 28S en insectos se separan cuando el ARN se encuentra denaturado, debido a que el puente de hidrógeno que los une se rompe.

Se obtuvo ADNc de buena calidad, debido a que se amplificó 3 genes distintos de aproximadamente 500 pb (Figura 10) como se esperaba, y de alta especificidad. Este óptimo resultado es consecuencia de la buena calidad del ARN que se pudo obtener, además de la inclusión de dos tipos distintos de cebadores en una misma reacción de síntesis, estos son, una mezcla de oligo “dT primers” y “random primers” proporcionados por el kit, tal como lo sugiere el reporte Doak, y Zair (2012), en el que se afirma que la

sensibilidad de sintetizar el ADNc blanco aumenta, al utilizar una mezcla de ambos tipos de cebadores.

Aprovechando la capacidad de adicionar un nucleótido de adenina a los extremos de los productos de PCR de la enzima polimerasa de *Thermus aquaticus*, se realizó la PCR de los genes blanco para clonar con tiempos mayores de extensión final comparado a lo habitualmente utilizado. Se logró obtener los amplicones de los genes blancos con el tamaño esperado. A 54 °C amplifica la mayoría con especificidad (Figura 11). Los dímeros de cebadores observados luego de la PCR, no representaron ninguna complicación posterior en el proceso de clonamiento, porque el kit de purificación para productos de PCR rindió muy bien, como se observa en la Figura 11.

Entre las opciones de vectores, para obtener ARNdc en bacterias, se eligió a Litmus 38i (NEB Biolabs), debido a las siguientes características: presencia de dos promotes T7 que permitan la síntesis del ARNdc, resistencia a diferentes antibióticos como ampicilina y tetraciclina; facilidad para la selección de bacterias clonadas mediante coloración de selección azul/blanco por el sistema IPTG-XGAL y presencia de un *polilinker* con sitios de restricción para enzimas con corte romo que permite la adición de timina. Los resultados satisfactorios de la clonación confirman la practicidad de utilizar este vector. Otros reportes utilizan este vector para obtener ARNdc. Por ejemplo, en el de Borgio *et al.* (2010), se lo utilizó para la transcripción *in vitro* de ARNdc de 5 genes de insectos chupadores, utilizando los sitios de restricción de las endonucleasas *Apa1* y *SnaB1*, y modificando las secuencias mediante PCR para que contengan estos sitios de restricción. Sarathi *et al.*, 2008, clonaron en este vector el gen VP28 para la producción bacteriana de ARNdc, a gran escala, para el control de WSSV (*white spot syndrome virus*) en camarones, para lo cual utilizaron los sitios de restricción de *BamHI* y *EcoRI*, que fueron incluidos en la secuencia por PCR. Prentice, *et al.* (2017), utilizaron esta misma metodología (uso de diferentes sitios de restricción),

para clonar 24 genes del gorgojo del camote *Cylas puncticollis*, para la producción bacteriana de ARNdc.

El vector Litmus 38i se extrajo inicialmente con dos metodologías: por lisis alcalina y por kit GenElute™ Plasmid Miniprep (SIGMA). En nuestros ensayos, la lisis alcalina no dio buenos resultados ya que se obtuvieron extracciones contaminadas. En la Figura 12 se observa que se presentan bandas adicionales a las principales estructuras del vector Litmus 38i. Entre ellas, dos bandas por debajo de los 2000 pb, estas dos bandas probablemente pertenezcan al ARN proveniente de la bacteria, ya que este ácido nucleico se pudo aislar junto al vector. Este ARN, pudo deberse a que la ARNasa A no actuó debidamente al estar incluida en el tampón de resuspensión inicial. De esta forma la ARNasa A, tal vez no se encontraba a las condiciones óptimas para su acción, tal como se menciona en el capítulo 7 de Molecular Cloning (Sambrook, 2001), La ARNasa A presenta un amplio rango de condiciones para su acción, pero actúa mejor a un rango alcalino pH (7.0-7.5), a una temperatura de 60 °C y a una concentración de 10 µg/mL. Nosotros lo utilizamos a un pH más básico (pH 8.5). En la Figura 12 también se observan bandas de mayor peso molecular a los 4000 pb, las cuales probablemente se tratan de ADN cromosomal de la bacteria. El método de lisis alcalina que se empleó se basa en las diferencias, con respecto a la forma y tiempo de desnaturalización y renaturalización del ADN de plásmido versus el ADN cromosomal. Los plásmidos al tener un tamaño menor, pueden ser separados fácilmente de las moléculas de ADN cromosomal, que son grandes y precipitan más rápido. Nuestros resultados muestran que el paso de lisis celular pudo no ser óptima, en que el tiempo de incubación de la lisis se sobrepasó, por lo que se lisó también el ADN cromosomal y consecuentemente precipitando de la misma forma que el ADN plasmídico (Casali y Preston, 2003).

Para obtener el vector Litmus 38i modificado (T-vector), en nuestra metodología de clonación, se probó dos métodos. El primero que emplea la enzima deoxinucleotidil-

transferasa terminal (TdT) y el nucleótido ddTTP (didesoxitimidina trifosfato) para añadir un residuo ddT a un plásmido linearizado con extremos romos (Marchuck *et al.*, 1991), lo que asegura la adición de un residuo T, solamente. El segundo método, es con la acción de la enzima Taq polimerasa y el nucleótido dTTP (desoxitimidina trifosfato), propuesto inicialmente por Holton y Graham (1991) que son usados para añadir un 3'T a un plásmido con extremos romos. Nuestros resultados (Figuras 15 y 16) muestran que se pudo obtener clonación solo con la primera técnica, ya que se observó colonias blancas y se comprobó la presencia del inserto posteriormente.

Uno de los principales problemas para la selección de las colonias blancas es la presencia de gran cantidad de colonias azules. Este resultado puede deberse a distintos factores. Inicialmente se pensó que se debería a la recircularización del vector al someterlo a ligación con el producto de PCR, evidenciando, por lo tanto, que este tipo de vector no presentaba la modificación de la timina adicional. En ese sentido, para evitar la gran cantidad de esas colonias azules, el vector Litmus 38i, que fue modificado, fue sometido a una autoligación por 24 horas a 14 °C, luego el vector fue cargado en un gel de electroforesis. Como se observa en la Figura 14 no se distingue la fracción del vector no modificado. Si se hubiese podido detectar, nuestro próximo paso hubiera sido purificar la fracción que no se recircularizó, a partir del gel, y seguir con los siguientes pasos de transformación, para obtener mayor cantidad de células blancas, tal como lo especifica el protocolo estandarizado de clonamiento de Kamath y Ahringer (2003) en que llegan a realizar genotecas de cientos de amplicones por medio de estas variaciones en la técnica general de *TA cloning*. Sin embargo, no fue necesario este paso, además se hubiera complicado la metodología para su uso a mayor escala.

Se tuvo cuidado de trabajar con los materiales recién preparados sobre todo con el vector modificado y el producto de PCR, debido a una eventual pérdida de timina en el vector, y/o

de la adenina en el producto de PCR, ya que pudieron hallarse nucleasas en la solución de vector o en la reacción de la PCR, que pudieron activarse con el descongelamiento (Casali y Preston, 2003).

Inicialmente, para corroborar la presencia del inserto, se realizó la PCR directamente de la colonia, la cual resultó solo para algunos vectores, esto puede deberse principalmente a la excesiva cantidad de bacterias que pudo haber sido colocada en la reacción de PCR. Está reportado en el texto de consulta de Maniatis, *et al.* (1982), que el uso de gran cantidad de bacterias en una PCR altera el pH, así como la concentración de sales, parámetros fundamentales a tener en cuenta para el buen funcionamiento de la Taq polimerasa, ya que las bacterias al ser calentadas liberan todo su contenido celular.

Este trabajo presenta una metodología de clonación con secuencias de genes de *P. longifila* y con potencial a ser utilizada para la producción de ARNdc, ya sea en el *screening*, a gran escala, de genes candidatos a silenciar y/o para su uso en el establecimiento de una estrategia de silenciamiento por ARNi, en campos de cultivo. La metodología de clonación para la producción de ARNdc se basó en bacterias modificadas, capaces de sintetizar y proteger el ARNdc, como la cepa bacteriana HT115 (DE), creada por Lisa Timons (2001). Por eso, se pensó en una opción práctica que permita el clonamiento de múltiples genes sin que interese: la direccionalidad del inserto en el vector, y las secuencias de los sitios de restricción de las endonucleasas compatibles. Por lo que, se eligió la técnica del *TA cloning* (Zhou, M *et al.*, 2000), en la que se aprovecha la capacidad que tiene la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* de añadir un adicional 3'A al replicar una secuencia de ADN. Así estos productos de la PCR pueden ser ligados a vectores modificados llamados T-vector, los que presentan una timina añadida. La técnica universal *TA cloning* es especialmente usada cuando sitios de restricción compatibles son no disponibles para el subclonamiento de fragmentos de ADN de un vector a otro ((Zhou, M *et al.*, 2000).

7 Conclusiones

1. Se logró implementar una metodología, fácil de realizar en laboratorio, de clonamiento de secuencias de *P. longifila*., con potencial para utilizarlo en la producción de ARNdc.
2. La modificación del vector Litmus 38i por la reacción con la enzima Transferasa fue la técnica que permitió modificar eficazmente el vector para el clonamiento de las secuencias de *P. longifila*
3. Se logró obtener bacterias *E. coli* Novablue transformadas con vectores recombinantes que presentan el inserto de 18 genes de *P. longilia*.

8 Referencias bibliográficas

- ALTSCHUL, Stephen F., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 1997, vol. 25, n° 17, p. 3389-3402.
- ARAUJO, R. N., et al. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2006, vol. 36, n° 9, p. 683-693.
- Ausubel, F., et al., eds. 1993. Current Protocols in Molecular Biology. Chapter 4 Preparation and Analysis of RNA.
- BAUM, James A., et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature biotechnology*, 2007, vol. 25, n° 11, p. 1322.
- BETANCOR, Laura, et al. Genética bacteriana. *Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR). Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3ra Ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR*, 2008, p. 65-90.
- BORGIO, J. Francis. RNAi mediated gene knockdown in sucking and chewing insect pests. *Journal of Biopesticides*, 2010, vol. 3, n° Special Issue, p. 386.
- BOUTROS, Michael, et al. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science*, 2004, vol. 303, n° 5659, p. 832-835.
- BROWN, Terence A. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. John Wiley & Sons, 2016.
- BROWN, Terry. Genomas/Genome. Ed. Médica Panamericana, 2008.
- CASALI, Nicola; PRESTON, Andrew (ed.). *E. coli plasmid vectors: methods and applications*. Springer Science & Business Media, 2003.

- CEDANO, Carolina; CUBAS, Pedro. Baeuveria bassiana (Bals) Vuill y Metarhizium anisioplae (Metsch.) Sorokin para el control de pupas de *Prodiptosis longifila* Gagné en el cultivo de esparrago. *Scientia Agropecuaria*, 2012, vol. 3, n° 1, p. 29-34.
- DÍAZ, B., et al. *Prodiptosis* n. sp.(Diptera: Cecidomyiidae) plaga de la alfalfa y otros cultivos. (*Dic 1981*) v. 24 (1) p. 95-97, 1981.
- DÍAZ, B., et al. *Prodiptosis* n. sp.(Diptera: Cecidomyiidae) plaga de la alfalfa y otros cultivos. (*Dic 1981*) v. 24 (1) p. 95-97, 1981.
- DOAK, Shareen H.; ZAÏR, Zoulikha M. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: technical considerations for gene expression analysis. En *Genetic Toxicology*. Springer, New York, NY, 2012. p. 251-270.
- FIRE, Andrew Z. Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, vol. 46, n° 37, p. 6966-6984.
- FIRE, Andrew, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 1998, vol. 391, n° 6669, p. 806.
- GAGNÉ, Raymond J. Revision of *Prodiptosis* (Diptera: Cecidomyiidae) with descriptions of three new species. *Annals of the Entomological Society of America*, 1986, vol. 79, n° 1, p. 235-245.
- GALLIOT, Brigitte, et al. RNAi gene silencing affects cell and developmental plasticity in hydra. *Comptes rendus biologies*, 2007, vol. 330, n° 6-7, p. 491-497.
- GAN, Defang, et al. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant cell reports*, 2010, vol. 29, n° 11, p. 1261-1268.
- HAKIM, Razi S.; BALDWIN, Kate; SMAGGHE, Guy. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual review of entomology*, 2010, vol. 55, p. 593-608.

- HOLTON, T. A.; GRAHAM, M. W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic acids research*, 1991, vol. 19, n° 5, p. 1156.
- HORN, Thomas; BOUTROS, Michael. E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents—2010 update. *Nucleic acids research*, 2010, vol. 38, n° suppl_2, p. W332-W339.
- HUVENNE, Hanneke; SMAGGHE, Guy. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of insect physiology*, 2010, vol. 56, n° 3, p. 227-235.
- KAMATH, Ravi S., et al. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology*, 2000, vol. 2, n° 1, p. research0002. 1.
- KAMATH, Ravi S.; AHRINGER, Julie. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 2003, vol. 30, n° 4, p. 313-321.
- LI, Xiaoxue; ZHANG, Mingyan; ZHANG, Hongyu. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PloS one*, 2011, vol. 6, n° 3, p. e17788.
- LUQUE CABRERA, José; HERRÁEZ SÁNCHEZ, Angel. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier, 2006.
- MAMTA, B.; RAJAM, M. V. RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2017, vol. 23, n° 3, p. 487-501.
- MANIATIS, TI; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbor. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

- MARCHUK, Douglas, et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic acids research*, 1991, vol. 19, n° 5, p. 1154.
- NAPOLI, Carolyn; LEMIEUX, Christine; JORGENSEN, Richard. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The plant cell*, 1990, vol. 2, n° 4, p. 279-289.
- NEW ENGLAND BIOLABS, 2018. LITMUS 38i Vector. Disponible en: <https://international.neb.com/products/n3538-litmus-38i-vector#Product%20Information>
- ORII, Hidefumi; MOCHII, Makoto; WATANABE, Kenji. A simple" soaking method" for RNA interference in the planarian *Dugesia japonica*. *Development genes and evolution*, 2003, vol. 213, n° 3, p. 138-141.
- PAPIĆ, Ljubomir; GARCÍA, Katherine; ROMERO, Jaime. Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas. *Latin american journal of aquatic research*, 2015, vol. 43, n° 3, p. 388-401.
- PEÑA, J. E.; GAGNE, Raymond J.; DUNCAN, R. Biology and characterization of *Prodiptosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) on lime in Florida. *Florida Entomologist*, 1989, p. 444-450.
- PRENTICE, Katterinne, et al. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae). *Pest management science*, 2017, vol. 73, n° 1, p. 44-52.
- PRICE, Daniel RG; GATEHOUSE, John A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in biotechnology*, 2008, vol. 26, n° 7, p. 393-400.
- PRIMROSE, Sandy B.; TWYMAN, Richard. Principles of gene manipulation and genomics. John Wiley & Sons, 2013.

- RAMADAN, Nadire, et al. Design and implementation of high-throughput RNAi screens in cultured *Drosophila* cells. *Nature protocols*, 2007, vol. 2, n° 9, p. 2245.
- RODRIGUEZ, Carlos. BAYER le declara la guerra a Prodiplosis, 2011, AÑO IV n° 24, (citado 15 julio del 2017), p. 16-17. Disponible en: https://issuu.com/normarm/docs/n_24
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 144. 2001.
- SARATHI, M., et al. Efficacy of bacterially expressed dsRNA specific to different structural genes of white spot syndrome virus (WSSV) in protection of shrimp from WSSV infection. *Journal of fish diseases*, 2010, vol. 33, n° 7, p. 603-607.
- SARATHI, M., et al. Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Marine biotechnology*, 2008, vol. 10, n° 2, p. 198.
- SAURABH, Satyajit; VIDYARTHI, Ambarish S.; PRASAD, Dinesh. RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*, 2014, vol. 239, n° 3, p. 543-564.
- SIOMI, Haruhiko; SIOMI, Mikiko C. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 2009, vol. 457, n° 7228, p. 396.
- TABASHNIK, Bruce E., et al. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature biotechnology*, 2008, vol. 26, n° 2, p. 199.
- TEREINIUS, Olle, et al. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of insect physiology*, 2011, vol. 57, n° 2, p. 231-245.
- TIAN, Honggang, et al. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS one*, 2009, vol. 4, n° 7, p. e6225.

- TIMMONS, Lisa, et al. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 2001, vol. 263, n° 1, p. 103-112.
- TIMMONS, Lisa; FIRE, Andrew. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 1998, vol. 395, n° 6705, p. 854.
- TIRABASSI, Rebecca Bitesize Bio 2012. Foundations of Molecular Cloning - Past, Present and Future Disponible en: <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/foundations-of-molecular-cloning-past-present-and-future>
- VALAREZO, Oswaldo, et al. *Prodiptosis longifolia* (Diptera: Cecidomyiidae), principal plaga del tomate en el Ecuador. *Manual*, 2003.
- WALSH, D. P., et al. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect molecular biology*, 2009, vol. 18, n° 1, p. 11-19.
- WANG, Yubing, et al. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PloS one*, 2011, vol. 6, n° 4, p. e18644.
- WINNEBECK, Eva C.; MILLAR, Craig D.; WARMAN, Guy R. Why does insect RNA look degraded? *Journal of Insect Science*, 2010, vol. 10, n° 1, p. 159.
- YANG, Guang, et al. Development of RNAi in insects and RNAi-based pest control. En *Pesticides in the Modern World-Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. InTech, 2011.
- YU, Na, et al. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect science*, 2013, vol. 20, n° 1, p. 4-14.
- ZHANG, Hao; LI, Hai-Chao; MIAO, Xue-Xia. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect science*, 2013, vol. 20, n° 1, p. 15-30.

- ZHOU, Ming-Yi; GOMEZ-SANCHEZ, Celso E. Universal TA cloning. *Current issues in molecular biology*, 2000, vol. 2, p. 1-8.
- ZHU, Fang, et al. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest management science*, 2011, vol. 67, n° 2, p. 175-182.

9 Anexos

Anexo 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS

- Medio Luria Bertani

Se utilizó para el crecimiento masivo de cultivos. Los componentes del medio se muestran en la Tabla 9. Para preparar medio sólido LB, el cual fue utilizado para el aislamiento de colonias, se le añadió 20g/l de Bacto agar.

Tabla 9. Componentes del medio LB líquido

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|----------------------|--------------|---------------------|
| Bacto triptona | 5 g | 10 g/l |
| Extracto de levadura | 2.5 g | 5 g/l |
| NaCl | 5 g | 10 g/l |
| Agua destilada | Hasta 500 mL | - |
| Volumen total | 500 mL | |

Nota: Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5M, y autoclavar. Para la preparación de medio sólido LB, se le añadió 20g/l de Bacto agar antes de autoclavar.

- Medio SOC

El medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) se utilizó para la recuperación de las células competentes de *E. coli* Novablue transformados. Los componentes del medio se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Componentes del medio SOC

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|------------------------|--------------|---------------------|
| Bacto triptona | 10 g | 20 g/l |
| Extracto de levadura | 2.5 g | 5 g/l |
| NaCl | 0.25 g | 0.5 g/l |
| KCl (250 mM) | 5 mL | 2.5 mM |
| MgCl ₂ (1M) | 5 mL | 10 mM |
| Glucosa (2 M)* | 5 mL | 20 mM |
| Agua destilada | Hasta 500 mL | - |
| Volumen total | 500 mL | |

* La solución de glucosa (esterilizada por filtración) debe ser añadida luego de haber autoclavado el medio y enfriado a 55 °C aprox.

Anexo 2. NUCLEÓTIDOS DE LOS AMPLICONES DE LOS GENES BLANCOS UTILIZADOS

| Gen blanco | Secuencia |
|--|--|
| <i>Small bristles</i> | <p>>1_1 596 bp</p> <p>GGCAAAACCATCATTTTTGGTCGATCCAACCCGCGCTGACATTGTGAGTCAATTCATTTT GCAATACTTTGCCGTATTTCGATTGAGACAATCGACAACCGTTGCTAGATGCCTACCATGA AAATGCCATGTTTTCGTTAACATGTTTCATACCATCCCAATCCCGATATTCGACTGACCAA GTATTTGCCACACAATCGAAATTTGGTTTCGTGTCAAAGAACCAGAGAAACGAAAGAATTT TCTGAAAATTGGCCGTTTACCTGTGGTTTCATTTTTGTGCGAACTACCACACACCGAGCA CGATTCACAATCATTCGCTGTTGATTTTACGCTATCCATGCCGTTTATCAGTGTGACCGT AACTGGAATATTCGGTGAAAAACAATCCGGAACAACATCGGTTTCGACAGGAGTTACGTTT GTTCCATCGTACAATGATTCTTGTACCAGTCGGCAGTGGATGGTGCATAAAGAATGACAT GTTGCACATAAATACGTTGACAATGGCACAATTGAAAACCGCATTCAAGCCAATCGCACC AGTTCCACCGACAACCGGTCCCATTCAACCGCCAGTCGTTCCAACACCAACAAGTG</p> |
| <i>Diminutive</i> | <p>>3_1 554 bp</p> <p>GTGCCCATTTCTTCGTTTCATTTCCGGTATGACTGCGTTTTGATGCACCGATTGATGGTGTG CATGAATTGCGTCCGGATGATGATGGGCTTGACGAGATTTTTTTGCTAATTTTCGAACGT TTTGATTTGGAATTTGAGCAACAGCACCAACACTGATTGACTAACACGTTTGCGTGAG GCGACTAAACGAATCGGTGAACCGCCAGCATTGGCGATGCAAGTTCGGTGAACCTTTA CTCGCGTATGCTGAATCATCGGATGAACCATTTGAAATGCGACGACGTTGTATCGTATGT GAACCGGTTGTTGTGTTTACCCTATGCGTGAGGTGATTTTATTTTGAATGCACGACGA TCACGGGCTGATGGATTTGTCCGTAAGTTCTTATCACCACGGAGACAACGTCAATTTCT TCCTCTGAATCAGATGGTGTGTTGTACGCCAATCCGATGACATCAACGCGGCTTTTACTT CTTGATAGCTGTGGTCACTGTGCATACTTGTGTAATGTCGTAGGCTGTGATTGTGTTT TTCGATGCCGAATT</p> |
| <i>oo18 RNA- binding protein</i> | <p>>4_1 457 bp</p> <p>CAACACCGACATCCACAAAAGCCGAACATGTACAATTCAAACATCCAGTCTGGTCAAAT CCGGCATCATCAATGCCTTGGAAGCACAACAACAAGCTGCCATTAACAACACCATT CCGCAGCAACAAAACCATCAACAACCATGGAATCGTGGCCGTTCCGTTCCGAATTTGAAT CCAATGTCGAACAATTTACCAAAATCGAAAGCCAACATCGCCAAATCCAGGCATGTCTGCA TTTGATCGTCACAATGCGGCATTACGTACCAATGAAATACAGACGCAGCACATCGTTC CCTGGTAAGGTACAAGGTCAAATTCATGTCATCATAGCAATGTTGTTGATATCAGTGGA CAAGGACATAATAATCTATCGCATGGTCCAATCGATATGAATGCATTAGACGATGCCCGG GATCAATTCATGCAATATCAAGAACGACTTGGCAATG</p> |

| Gen blanco | Secuencia |
|---|--|
| | |
| <i>Membrane protein involved in Golgi transport</i> | <p>>gen_5_1 598 bp</p> <p>TTGTTTCGTTTCAGAGTCACCGGTTAACTTATCAACGATCGTGCTAATTCCCGGCAAATTAAGAACTCGACCCAAAATCGGTACTCTTCGCAAAAAGTTTATGGCAACTGGGAAGAAACCGCTAAACAATAGGAAAAATCCATAGGATTCAATAATCATTCCAATCAATGGCCATCCTAATAAAACAATCACAATACCACCAAAAAATGCGAGCGATGACTTAATCTTCTTTCTTTGTACAAAATCGAAACGTTTCGTTCCAGCCCAATGATGCAAGCCAAGCCACATATGAACAAAATATTCCAATCGCCAAAAGACCCTTATCAAATAGCAGCAATACGCCGAGAAATACAAATGCAACGCCGAACCCCGCAAGACCAACTCCAATTTTTTGTGTATCACTTATTTCGAACATGATTGAAATTAATTCTATAAACTATTGAGATACGTAGATATATTTAAACAAAATTTAATTTTTCTCTGATCGCATCAAAATAAATGCAGAATAAATGACATTGTGTATCAAAAAAATTGTGTTTCTTTATTTTAACTGACGATAAAACATCCACGTCAAAGACGAAATGTCAAGCAGCAA</p> |
| <i>Translation initiation factor</i> | <p>>gen_9_1 578 bp</p> <p>TGACCACTGTATCGGTTGGATCGTCCAATGATGCCATCAATTCTTCGTTTATAATCATTTTACTAATGACGGAATGCACCTTTGGCAATGCCAAATCAAACATTTTCAGCCAAGCTTGGCATGCTAATCGATGAATATACATTGCAATAGGTGAACAAATAGGTGCGCAACGATTCTTCTTTGATGAATTTGGTGAGCATGTCACGAACGCGATCGGCTTCATAGAACAAATCCCATACTTTGTGTTTCATCTTTTTGTTGACGATGAATTGTGCACATGCCGACCAATTACCGCAACGCATTGCTTTTGCTGCGGCCACAACGTGTTACGCATCGATTCTGGTGGACCGACCAACGATTGACGCTCTGATGATCGCAATTGTTGATAGAATGTTTTGCTGATCATACGACGTCTTGCGTCGAATTCATGAGCGGCCATGTATGGAATTTCAAGGAGCATTGCCGATACCAAATAGACACATTCCAACAATTCAAATTGATGTGCATGTGGAATGGCATTGACGTTGTTTTTCCACCTTTTCTTGTTTCGGGACTACGTTTCATGTTGACGTTGTGGC</p> |
| <i>Chloride channel protein EriC</i> | <p>>gen_13_1 595 bp</p> <p>ACAGGTGCCATTGATGTGAATAATACAATTGATTGACCGGCAATTCCATCGATGAAACGTTTTGCATTTGCGATTGCCAAATTAAGGTACCGTCGTAACAAATCCAATAAATATTGACTTTTCCTTAGACACAACAACCGGATAGCCATTGTGTTTCGGTTTCCTTCAGAAGATTCACAATGTCATCCACTGTCATTGAGTCTTGCGTAATCACTGATAATGTCTCGTTTCGCTTTGGTTGCATAACATCAGCTGCAAGGTGGTATGTGCAAATCTTCTTTGCCCCAAGAATGGATAACCATTTAATGCAATGTGTGCATCGTAAATACCCTCTCGGCCCAATGCATCGCCAACCCATTGGATGCCATTGCTGCTGCCATCAATGGTACGATATAGTTAACACCTCCAGTTAATTCAAACATAATGACAATCAATGAAATTGTCATCCTTGTAACACCGCCAGAACAGCGGCCGCT</p> |

| Gen blanco | Secuencia |
|--|---|
| | CCAACCATCGCATACAGTCCGGGTGTTATACAATCGTCTCCCGTGGAACATTACCAGAG AATATCCATATTTTGGATAGTTATACGCCAATTGTTCCATACCAATGCCAACAA |
| <i>Bellwether</i> | >14_2 293 bp GCACCAATGAATCGACGGCTTTAATACCAGTTTGCATAGGTTACGTACAGATACACGGG GAATGATACCTGGAGCTTTTGTTCGACACGGAAACGTTGTTTTGTACCCAATGGACCTT TGCCATCAATTGGATTACCTAAGGCATCAACGACACGTCCCAAAATTCGTCACCAACTG GTACATCGACAATAGCACCAGTACGCTTGACAATATCACCTTCCTTGATCAATTTATCGT TACCGAAGACGACAATACCGACATTGTCTGTTTCCAAATCAATGCCATACCC |
| <i>Vesicle coat complex</i> | >gen_15_1 591 bp TGTGTCACGCAAATCCAAATGAACGTTCCCGTTTCATTGCTTGCAATTACAAATTTGCTCA ATTATCATCGAATGCGGTTTCGTTACGAAGCGGCCGGCACATTGATCACATTGTCAACTG CCCCACGGCAATCAAAGCTGCGGCCAGCTGCTACATCGATTTGATCATCAAAGAAAGTG ATAACAATGTTAAATTGATTGTTTTGGACCGTTTGATTGCAATCAAAGAGAATGAGAACAA CCGAACGTGTCATGCAAGATTTAGTTATGGATATTTTACGTGTCTTGGCTGCACCGGACA TTGAAGTACGCCGCAAGACATTGAATTTGGCCATGGATTGGGTATCATCCAGAAACATTG AAGAGATGGTACTCGTTTTGAAGAAGGAAATTTCCAAAACGCACAACGTGCAACATGAAG ACACCGGAAAATATCGTCAATTGCTTGTTTCGCACATTGCATAGCTGTTGCATTTCGCTTCC CAGACGTTGCAGCCACTGTCAATTCAGTTTGTCCGAATTTTATCCGACACCAATGAGC AAGCTGCCACCGATGTGCTTGTTTCATTTCGTGAAGCCATCCAGAAATTC |
| <i>Actin cytoskeleton organization</i> | >gen_16_1 464 bp TTAGTGAGGCGACAGTGGAAAAAGTCACTTTTTGAGTCATAGTCGTCGAAACAAAGTGC GAATTATCTTGACAAATGCAAACTAAAAATCACGAAACGAATTATTTTCATCTGCTGTGT AACGTAGCGTATAAACGGTCAAACGATTCGGTGTTCAATTCAATTCATTGTGTTATTTT TCATTGTGTGACATAAATCGAATCGAATTGAAAAGCAAACGAAATCATGCAAGAAAAATCA TCCCGAATTGTATGAGGAGGTGAAATTGTATCGAAATGCTCGTGAACGTGAAAAATATGA TAACATGGCTGAATTGTATGCGCTAATAAATACATTGCAAAATTTAGAAAAAGCATACAT TTGGGATTGTATTACACCACAAGAATACACAGCATCATGTTCAAAATTATTGGTGCAATA TAAAGTGGCCTTTAAACAAGTGCAAAGCGATGAATCCCAACAG |
| | >gen_17_1 246 bp |

| Gen blanco | Secuencia |
|---|--|
| <i>Ubiquitin fusion degradation protein 2</i> | <p> TTCGGATAAAAAGGCATCGACAACCTCTTTTCATTGAGAAATTTGGTATCAACTGATCTTG TGTGAGTTTTCACGCGGGTGACAGGATCGAAATGACCAACACGTTGCAGATGCTCTTCAAT ATCTTTGCGCTCGTATGTGATGCCGCTCGGCGTAATAACTGGATCAACGAGAATTTCAAA GCTAATTTTACCGCATAAGTAATCGGGTACGTACGTTTTTCGACGCCGATCATCAATTTT AGCGAA </p> |
| <i>Negative regulator of transcription</i> | <p> >gen_18_1 580 bp TCCAAAATGAAAATCGCACAAAATTCGGGGAAATCGTGCAACAGCACGAGCAACACGCG CAATGTTCTTTGTACAACAATTGGACCGGTTTGGCCAATTCGGCATTACGTAAAAATGG TGCCAAATATCTGAAGAGATCCAACAATAGTTGTGAGTACATGGTCCAGCCTTTTTGTTG TGGTGTCAATGCCAAAATGCGACCGATGAACACACGATGTGAAATGAGCTCAAGCCATGA GTAGCAAAATGCTGGCGCAATTGATGGTCGCAAAATGTGATATGTGTGACAGAATGCGGT CGATACATTCAAACCTGATTGAATCCAATTCCTGGTGGTCAATTCCAAAACAGCATAAT AAAGAGACGATGATAACCAAGTTGCTGGAATGATGTTCTTGTGCTCTTGATCTTGTA CAGCACACCGATTATTATGCCCAAAATTTTGTTAAGCAAATTGATTTTGGTCGTTGCATT TGGATTATCGCCCGAATATTTAACAATCAATGCAATCAAACGCACAAACGAATCGATGTA ATGGAAAATTTTCGTCTTATTTTGTTGTGGCGATGTTGTT </p> |
| <i>Regulatory particle non-ATPase 3</i> | <p> >18_2 566 bp TTCATATTGCGCGTACTTCGTTTCATTGCCAAACACACGTCGCAAAGTGAACACCATTGTT CTACGCAATTTAACGGCACATTTGTATCCGGCTGGTGCTGAACGCGATTTCGATCACACAG TTTTTGGACGCATTGCAACCGGGACAAGAATTGGAAGTGCAACGTACACGGGCAACAATT AAAACACCCATTCCCGAGGTCGATGCCTATTTACATTTGTTGGTGCTCGTTTTCTTGTTG GACAAATCGCAGTTAGACAAAAGCACACACATGCTCTGAAGCTTTGATCAAGAAAATTGTC GAACAGAATCGTCGCACATTGGATTTGATTGCGGCCAAAATTTATTTCTACTATTTCGCGC GTCGCCGAATTGACCGATTTCGTTGGAACCAATTTCGACGCTTTTTACACAACCGTTTGCCT ACCGCTACATTGAGAAACGACTTTGAAGGTCAAGCGGTGCTCATCAACTGTTTGCTACGT AATTATTTGCACTACTCGTTGTACGATCAAGCCGATAAATTGGTGAAAAAGTCAGTGTTTC CCTGAGACAGCAAGCAACAACGAATG </p> |
| <i>Female sterile (2) ketel</i> | <p> >21_2 590 bp AGAATTCGGCAAATGTCACCGGTTAGACCGACAGCAGCCACGCACACTTGGTATTCTTGA TGGTTTTTCAATCCCATGTACAAGTATGGTTTGAATGCATCCATGTATTTCAAGAATTTT TCACCCAACAATTCGGCCAATGTTGATACGGCCATCAATGCATCCTCTTGAACATTGCC </p> |

| Gen blanco | Secuencia |
|-----------------------------|--|
| | GATTTACCGGCACTGGTGCTGAACATTGTCAACAATGCGCCCATGATGGCATCACTGATT TGTTGGTGCATCTTCTGGTGTTACACGACGCAATACCGACTGGAGTGTGGCACACAAAAGT GATTGCAAATCGTTGAATTGATAGCGGTCGGTGTTGAATTGCGATTCCATTTGGAGT ACATGGTTGAGACGTTCAAGAATGACCATTGTTGTCTTTTGCACAACATTGTAACAATCG TTTGGTGCATTTTAAATCATGTCCATCAATGCTTCATAAGCAGCTGCACGCAAATTGGCC TGACCACAATCCTGACGATCGGTTGTTTCCAACAATTGTTGCACAATAAACTCAAAGTAT TGACTCAAGCAATTGTCTCTTGCATGCCTTCGCCGTTATTTTCTGGATC |
| <i>Noisette</i> | >22_1 536 bp GAGCATCGTAGTGCAACCAAAGAGAATGTTCAACGTAAACAGGCACGTACCGATGGTGAG CGAGAAGACAGTGACGCTGAAGCAAGCAATCAGATGTTGAAGAAGATGATGCCGATGAT GTGCCGTACAATCCAAAGAATTTACCATTGGGATGGGATGGCAAACCAATACCATATTGG TTATACAAATTACACGGATTGAACATCAGCTATAATTGTGAAATTTGCCGAAATTATACG TACAAAGGACCGAAAGCGTTTCAACGACATTTTGCCGAATGGAGACACGCGCACGGTATG CGATGTCTGGGCATTCCAATACAGCGCATTTTGCAAATGTTACACAAATCGAAGATGCA ATCACACTATGGGAGAAATTGAAGACACAAAAACAAGGCGAACGATGGATACCGGAGCAA GAAGAAGAATTTGAAGATTACAGGGCAACGTAGTGAATAAGAAAACATTGGAAGATCTT AAACGACAAGGATTGCTATAAAATCAACATTCAGAATGGGACACATTTTCAGCAA |
| <i>Caudal</i> | >25_1 588 bp CCACCGTCCAGCTTACATTTGAGCCCAACAATAAATAATAGTGCAAATGCAAATACAAGC GGCGACAATTTACAAAATGGCCTGCAGAATATTCCACCATCGCCGCCGAACACCGTCAAT TCCGTATGCAGCGAAATGTCGAGCCCAGGCATCGGATCGAACGGAATAGTGGTGTATT GGAAATGGAGATGCATCACCAAGCATGACATCGGCCAACAATTTATCACGACCAAAATCA CCGTATGAATGGATGAAAAAACCATCGTATCAAAGCCAACCAAGCTCCGGCAAAACCCGT ACAAAGGATAAATACCGTGTCGTTTATACAGACTACCAGCGTTTGGAAGTTGAAAAAGAA TATCATATGTCACATTACATAACGATTCTGTCGAAAACCGAATTGGCCCAATCGTTGCAA TTGTCCGAGCGTCAAGTGAATTTTGGTTCCAAAACAGAAGAGCAAAGGATCGTAAACAA ACAAAGAAGCGTGACGGTCCAGTTGGTAGCAGCGCAATTTTATCGAATAATTGTTCAAAT GTTGGTCTTGCAATTGCAACACCACAACATGGTAAATGGTCCGTCTGGT |
| <i>Microtubule-severing</i> | >gen_37_1 582 bp TAATGGTCTTAGCGGCAACCAATTTTCCATGGGATATTGATGAGGCGTTAAGACGTCGGT |

| Gen blanco | Secuencia |
|----------------------------------|---|
| <i>ATPase activity</i> | TGAAAAAGCGTATTTACATTCCCTTTGCCGAACGATGAAGGTCGCGAAGCGCTCTTGAAAA TTAATCTGCGCGAAGTGAAATTGGATCCAAGCGTCGATTTGAAAAGTATTTCTCGAAAAAT TACAAGGTTACTCAGGTGCTGACATCACAAATGTGTGTCGAGATGCAAGTATGATGTCGA TGAGACGTAAAATAGCCGGTTTGAAGCCGGAACAAATTCGACAGTTGGCCACCGAAGAAG TGGATCTTCCAGTGTCAACGCAAGACTTCAGTGAAGCCATTAGCAAGTGAATAAGAGCG TCTCGAAACAAGATTTAGAAAAATATGAAAAATGGATGCGAGAATTCGGTTTCGTCTGAT AAAAATCATCCAACAAAGAAAAATGAAGAGATAGGGAGAAAGTAAAAACAAACACTAAAC CGAAGAGACCGACAGTTTCATTCTAAAGAATCTTCAAAATTTACAGCTAACAGTTTTTAA AGTATTAAGAAGCGAACGAATCGTATAATGCCCGCGAAAAATG |
| <i>Nejire</i> | >39_1 350 bp ATCGGCAGCTGATTGAAGTTTGTCTTCCATGGCTTGCTTCAGTATATCTTTGTAATCCTG TATCGTTCTCTCAATCATACCCTTGTCAAGCATCTTTTTATACCAGTCTTGCAGACGCTT TGGCTTGGGTATCTTTGATCGGGTGGATGACAATGGAAGATGTAGTCATCGCCTTCGGA TGGTGGACAAGCCCAAATGTGTGCCATTGTATAGCCCAACTGTTTGGCATAGTCCATGTA TCCGAGCAATATTTTCATGATAGACGGCAGTACGATATTGTGAGGTTTGAAAAATGCAC AGAATCTAAATAGGCAATGTAAACACGTCTCGTGTTTGGCGGTGAACATT |
| <i>Histone acetyltransferase</i> | >gen_40_1 554 bp ACGAAAAATGGATGCGATTCCACCGTCACCAATGACACCGATAACACCGATAACACCGGT TACACCAATATCGGTTGACACAACATCGGCCATTCTCAAATCAACGCCATCCATTGAGAA GATAACAGCATCGGAACCTGTATCGATTCCATCAACACCAACCGTTGGAGGTGAAGATTC AAACGATGCTAGTCAACCGGCGCCAACGTTAACACCACGACAATCAGGAAGTATGGTCAC ACACCATGACGATGTTGTGACGCGAATGAAAAACATTGAAATGATAGAATTAGGAAAACA TCGAATTAAACCATGGTACTTTGCACCATACCCTCAGGAGATGTGCGGCGAACCTGCAT TTATATTTGTGAATTTTGTAAAAATACCGAAAAAGTCGAAAGTGTGGAACGTCATTT AGTCAAATGTAATCTGCGTCATCCACCCGGCAACGAAATTTATCGCAAACAAACGATTTT ATTTTTTGAAATTGATGGCCGCAAAAACAAATGCTACGCACAAAATCTGTGCTTACTCGC CAAATTGTTTCCTTG |
| <i>SNAP receptor activity</i> | >gen_41_1 247 bp CGAAGCGGAACGTAACAAATTGCGTGAATTATTGGTCAGACATTCAGAACTAGAGAAAAAT TGAGCGGTCACTGGTGAAGTACGTGACATGTTTCTGCGAATTTACGCTTTAGTCATTGA ACAGAGTCCACTCATCACTCAAGTTGAATACTTCGCGCAGCAAGCTACCTTAAATATTGA CAAGGGCAATGCGAAACTCGAAAAAGCCCGCGAACTAAAAATCAAACGAATGAAGTGCAA AATCTGG |

| Gen blanco | Secuencia |
|---|--|
| | |
| <i>Microtubule-binding protein involved in cell cycle control</i> | <p data-bbox="464 477 703 510">>gen_45_1 242 bp</p> <p data-bbox="464 551 1326 734">TGCCTTTGCTATTCCCTCTGGTTGCACCCGGACGTCTTGCTGTTTGACGTGGTATTTGACG CTTTTGTGTCACCTCCGAGCAAATGTTACCAGTTCCGAGCTCATTCTGTATGGCTCCGGT ACCCAATGCAATGCCAAAACGTGCCTCCAGTGGATCATATTCTCGACCATCATAATTGCA ATCGAAAACTTTTTAAACCATTGCAAAAATTCGAAATTATCTTGAAACGTCCCTTTAT CA</p> |